

1. An invention described in the WO00/05264 relates to a G protein-coupled receptor protein, its partial peptide, DNA encoding the protein and its partial peptide, a vector comprising the DNA, methods for producing the peptide and its partial peptide, a transformant comprising the vector, an antibody that binds to the protein and its partial peptide, a method screening for ligands that binds to the protein, a method of screening for a compounds that changes the binding between its ligand and the protein, and a pharmaceutical composition comprising the compounds that change the binding between the ligand and the protein.

2. The amino acid sequence of the present invention which encodes a cDNA obtained from the methods described in the literature (DNA RESEARCH, vol. 453-59 (1997)) or according to it, has a homology to the sequence of known receptor, especially to the sequence of human ORF receptor.

3. The method of obtaining the amino acid sequence of our invention is different from one mentioned above, and the method has an inventive step.

PCT

世界知的所有権機関  
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願



<p>(51) 国際特許分類6 C07K 14/705, C12N 15/12, C12P 21/02, C07K 16/28, G01N 33/50, A61K 38/17, C12Q 1/68</p>	A1	<p>(11) 国際公開番号 WO00/05264</p> <p>(43) 国際公開日 2000年2月3日(03.02.00)</p>									
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/03909</p> <p>(22) 国際出願日 1999年7月22日(22.07.99)</p> <p>(30) 優先権データ</p> <table border="0"> <tr> <td>特願平10/207579</td> <td>1998年7月23日(23.07.98)</td> <td>JP</td> </tr> <tr> <td>特願平10/225060</td> <td>1998年8月7日(07.08.98)</td> <td>JP</td> </tr> <tr> <td>特願平10/284328</td> <td>1998年10月6日(06.10.98)</td> <td>JP</td> </tr> </table> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 武田薬品工業株式会社 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.)(JP/JP) 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号 Osaka, (JP) 財団法人 かずさディー・エヌ・エー研究所 (KAZUSA DNA RESEARCH INSTITUTE)(JP/JP) 〒292-0821 千葉県木更津市矢部1532番地3 Chiba, (JP)</p> <p>(72) 発明者: および</p> <p>(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ)</p> <p>小原 収(OHARA, Osamu)(JP/JP) 〒292-0801 千葉県木更津市鶴西2丁目20番25号 Chiba, (JP) 長瀬隆弘(NAGASE, Takahiro)(JP/JP) 〒292-0042 千葉県木更津市清見台南5丁目1番26号 Chiba, (JP) 野村信夫(NOMURA, Nobuo)(JP/JP) 〒292-0804 千葉県木更津市八幡台5丁目2番11号 Chiba, (JP) 日沼州司(HINUMA, Shuji)(JP/JP) 〒305-0821 茨城県つくば市春日1丁目7番地9 武田春日ハイム1402号 Ibaraki, (JP)</p>		特願平10/207579	1998年7月23日(23.07.98)	JP	特願平10/225060	1998年8月7日(07.08.98)	JP	特願平10/284328	1998年10月6日(06.10.98)	JP	<p>藤井 亮(FUJII, Ryo)(JP/JP) 〒305-0821 茨城県つくば市春日1丁目7番地9 武田春日ハイム303号 Ibaraki, (JP) 北原 治(KITAHARA, Osamu)(JP/JP) 〒305-0821 茨城県つくば市春日2丁目36番地の3 402号 Ibaraki, (JP) 茂木伸一(MOGI, Shinichi)(JP/JP) 〒302-0121 茨城県北相馬郡守谷町みずき野1丁目 17番地16 Ibaraki, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 朝日奈忠夫, 外(ASAHI, Tadao et al.) 〒532-0024 大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号 武田薬品工業株式会社 大阪工場内 Osaka, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AE, AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CU, CZ, EE, GD, GE, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ZA, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
特願平10/207579	1998年7月23日(23.07.98)	JP									
特願平10/225060	1998年8月7日(07.08.98)	JP									
特願平10/284328	1998年10月6日(06.10.98)	JP									
<p>(54)Title: NOVEL G PROTEIN-CONJUGATED RECEPTOR PROTEIN AND DNA THEREOF</p> <p>(54)発明の名称 新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質およびそのDNA</p> <p>(57) Abstract</p> <p>A protein originating in human brain, its peptide fragment or salts thereof; a DNA encoding the above receptor protein; a process for producing the protein; a method for determining a ligand to the above G protein-conjugated receptor; a method for screening a compound capable of altering the binding of the ligand to the protein and a screening kit therefor; a compound obtained by the above screening method or its salt; an antibody against the above G protein-conjugated receptor protein, etc. The above-described G protein-conjugated receptor protein originating in human brain or the DNA encoding the same is useful: (1) in determining a ligand; (2) in acquiring an antibody and an antiserum; (3) in constructing an expression system of a recombinant receptor protein; (4) in developing a receptor-binding assay system and screening a candidate for a drug with the use of the above expression system; (5) in designing a drug on the basis of a comparison with a ligand receptor having a similar structure; (6) as a reagent in constructing probes, PCR primers, etc. in gene diagnosis; (7) in constructing a transgenic animal; (8) as a drug such as a genetic preventive/remedy.</p>											

(57)要約

本発明は、ヒト脳由来の蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩、該レセプター蛋白質をコードするDNA、該蛋白質の製造法、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法、リガンドと該蛋白質との結合性を变化させる化合物のスクリーニング方法/スクリーニング用キット、該スクリーニングで得られる化合物またはその塩、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対する抗体などに関する。

本発明のヒト脳由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはそれをコードするDNAは、①リガンドの決定、②抗体および抗血清の入手、③組換え型レセプター蛋白質の発現系の構築、④同発現系を用いたレセプター結合アッセイ系の開発と医薬品候補化合物のスクリーニング、⑤構造的に類似したリガンド・レセプターとの比較にもとづいたドラッグデザインの実施、⑥遺伝子診断におけるプローブ、PCRプライマーの作成等における試薬、⑦トランスジェニック動物の作製、⑧遺伝子予防・治療剤等の医薬などとして有用である。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦	DM ドミニカ	KZ カザフスタン	RU ロシア
AL アルバニア	DE エストニア	LC セントルシア	SD スーダン
AM アルメニア	ES スペイン	LI リヒテンシュタイン	SE スウェーデン
AT オーストリア	FI フィンランド	LK スリランカ	SG シンガポール
AU オーストラリア	FR フランス	LR リベリア	SI スロヴェニア
AZ アゼルバイジャン	GA ガボン	LS レソト	SK スロバキア
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB 英国	LT リトアニア	SL シエラ・レオネ
BB バルバドス	GD グレナダ	LU ルクセンブルグ	SN セネガル
BE ベルギー	GE グルジア	LV ラトヴィア	SZ スワジランド
BF ブルキナ・ファソ	GH ガーナ	MA モロッコ	TD チャード
BG ブルガリア	GM ガンビア	MC モナコ	TG トーゴ
BJ ベナン	GN ギニア	MD モルドヴァ	TJ タジキスタン
BR ブラジル	GW ギニア・ビサウ	MG マダガスカル	TZ タンザニア
BS バルルーン	GR ギリシャ	MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TM トルクメニスタン
CA カナダ	HR クロアチア	共和国	TR トルコ
CC 中央アフリカ	HU ハンガリー	ML マリ	TT トリニダード・トバゴ
CG コンゴ	ID インドネシア	MN モンゴル	UA ウクライナ
CH スイス	IE アイルランド	MR モーリタニア	UG ウガンダ
CI コートジボアール	IL イスラエル	MW マラウイ	US 米国
CM カメルーン	IN インド	MX メキシコ	UZ ウズベキスタン
CN 中国	IS アイスランド	NE ニジェール	VN ヴェトナム
CR コスタ・リカ	IT イタリア	NL オランダ	YU ユーゴスラビア
CU キューバ	JP 日本	NO ノールウェー	ZA 南アフリカ共和国
DE ドイツ	KE ケニア	NZ ニュー・ジーランド	ZW ジンバブエ
DK デンマーク	KG キルギスタン	PL ポーランド	
	KP 北朝鮮	PT ポルトガル	
	KR 韓国	RO ルーマニア	

## 明 細 書

新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質およびそのDNA

## 5 技術分野

本発明は、ヒト脳由来の新規蛋白質（G蛋白質共役型レセプター蛋白質）またはその塩およびそれをコードするDNAなどに関する。

## 背景技術

- 10 多くのホルモンや神経伝達物質は、細胞膜に存在する特異的なレセプター蛋白質を通じて生体の機能を調節している。これらのレセプター蛋白質の多くは共役している guanine nucleotide-binding protein（以下、G蛋白質と略称する場合がある）の活性化を通じて細胞内のシグナル伝達を行ない、また7個の膜貫通領域を有する共通した構造をもっていることから、G蛋白質共役型レセプター蛋白質あるいは7回膜貫通型レセプター蛋白質と総称さ  
15 れる。

G蛋白質共役型レセプター蛋白質は生体の細胞や臓器の各機能細胞表面に存在し、それら生体の細胞や臓器の機能を調節する分子、例えばホルモン、神経伝達物質および生理活性物質等の標的として非常に重要な役割を担っている。

- 20 各種生体の細胞や臓器の内の複雑な機能を調節する物質と、その特異的レセプター蛋白質、特にG蛋白質共役型レセプター蛋白質との関係を明らかにすることは、各種生体の細胞や臓器の機能を解明し、それら機能と密接に関連した医薬品開発に非常に重要な手段を提供することとなる。

- 例えば、脳などの中枢神経系の器官では、多くのホルモン、ホルモン様物質、神経伝達物質あるいは生理活性物質などによる調節のもとで脳の生理的な機能の調節が行なわれている  
25 。特に、神経伝達物質は脳内の様々な部位に存在し、それぞれに対応するレセプター蛋白質を通してその生理機能の調節を行っている。脳内には未だ未知の神経伝達物質も多く、その



レセプター蛋白質をコードするcDNAの構造に関しても、これまで報告されていないものも多いと考えられる。さらに、既知のレセプター蛋白質のサブタイプが存在するかどうかについて分かっていなかった。

- 5 脳における複雑な機能を調節する物質と、その特異的レセプター蛋白質との関係を明らかにすることは、医薬品開発に非常に重要な手段である。また、レセプター蛋白質に対するアゴニスト、アンタゴニストを効率よくスクリーニングし、医薬品を開発するためには、脳内で発現しているレセプター蛋白質の遺伝子の機能を解明し、それらを適当な発現系で発現させることが必要であった。

- 10 近年、生体内で発現している遺伝子を解析する手段として、cDNAの配列をランダムに解析する研究が活発に行なわれており、このようにして得られたcDNAの断片配列がExpressed Sequence Tag (EST) としてデータベースに登録され、公開されている。しかし、多くのESTは配列情報のみであり、その機能を推定することは困難である。

#### 発明の開示

- 15 本発明は、ヒト脳由来の新規蛋白質（G蛋白質共役型レセプター蛋白質）、その部分ペプチドまたはそれらの塩、該蛋白質またはその部分ペプチドをコードするDNAを含有するDNA、該DNAを含有する組換えベクター、該組換えベクターで形質転換された形質転換体、該蛋白質またはその塩の製造法、該蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩に対する抗体、該蛋白質（G蛋白質共役型レセプター蛋白質）に対するリガンドの決定方法、リガン
- 20 ドと該蛋白質（G蛋白質共役型レセプター蛋白質）との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、該スクリーニング用キット、該スクリーニング方法もしくはスクリーニングキットを用いて得られるリガンドと該蛋白質（G蛋白質共役型レセプター蛋白質）との結合性を变化させる化合物またはその塩、およびリガンドと該蛋白質（G蛋白質共役型レセプター蛋白質）との結合性を变化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬な
- 25 どを提供する。

本発明者らは、鋭意研究を重ねた結果、ヒト脳由来の新規な蛋白質（G蛋白質共役型レセ

ブター蛋白質)をコードするcDNAを単離し、全塩基配列を解析することに成功した。そして、この塩基配列をアミノ酸配列に翻訳したところ、第1～第7膜貫通領域が疎水性プロット上で確認され、これらのcDNAにコードされる蛋白質が7回膜貫通型のG蛋白質共役型レセプター蛋白質であることを確認した。本発明者らは、これらの知見に基づいて、さらに研究を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、

(1) 配列番号：1、配列番号：3または配列番号：5で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とする蛋白質（G蛋白質共役型レセプター蛋白質）またはその塩、

10 (2) 第(1)項記載の蛋白質の部分ペプチドまたはその塩、

(3) 第(1)項記載の蛋白質をコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNA、

(4) 配列番号：2、配列番号：4または配列番号：6で表わされる塩基配列で表される塩基配列を有する第(3)項記載のDNA、

(5) 第(4)項記載のDNAを含有する組換えベクター、

15 (6) 第(7)項記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体、

(7) 第(8)項記載の形質転換体を培養し、第(1)項記載の蛋白質を生成・蓄積せしめることを特徴とする第(1)項記載の蛋白質またはその塩の製造法、

(8) 第(1)項記載の蛋白質、第(2)項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩に対する抗体、

20 (9) 第(1)項記載の蛋白質、第(2)項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩を用いることを特徴とする第(1)項記載の蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法、

(10) 第(1)項記載の蛋白質、第(2)項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩を用いることを特徴とするリガンドと第(1)項記載の蛋白質との結合性を变化させる化合物またはその塩をスクリーニングする方法、

25 (11) 第(1)項記載の蛋白質、第(2)項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩含有することを特徴とするリガンドと第(1)項記載の蛋白質またはその塩との結合性を变化させ

る化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

(12) 第(10)項記載のスクリーニング方法または第(11)項記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、リガンドと第(1)項記載の蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩、

- 5 (13) 第(10)項記載のスクリーニング方法または第(11)項記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、リガンドと第(1)項記載の蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬、

(14) 第(3)項記載のDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA、

- 10 (15) 第(1)項記載の蛋白質をコードする塩基配列を含有するヌクレオチド、および  
(16) 第(1)項記載の蛋白質をコードする塩基配列と相補的な塩基配列の一部を含有してなるヌクレオチドなどを提供する。

より具体的には、

- (17) 蛋白質が、①配列番号：1、配列番号：3または配列番号：5で表わされるアミノ  
15 酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～9個程度、さらに好ましくは数個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号：1、配列番号：3または配列番号：5で表わされるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号：1、配列番号：3または配列番号：5で表わされるアミノ酸  
20 配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または④それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有する蛋白質である第(1)項記載の蛋白質またはその塩、

- (18) 第(1)項記載の蛋白質もしくはその塩または第(2)項記載の部分ペプチドもし  
25 くはその塩と、試験化合物とを接触させることを特徴とする第(9)項記載のリガンドの決定方法、

- (19) リガンドがアンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP (バソ
- 5 アクティブ インテスティナル アンド リレイテッド ポリペプチド)、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP (カルシトニンジーンリレーティッドペプチド)、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、 $\alpha$ および $\beta$ -ケモカイン (chemokine) (例えば、IL-8、GRO $\alpha$ 、GRO $\beta$ 、GRO $\gamma$ 、NAP-2、ENA-78、PF4、IP10、
- 10 GCP-2、MCP-1、HC14、MCP-3、I-309、MIP1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、RANTESなど)、エンドセリン、エンテログアストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプチド、ガラニン、 $\alpha$ -ラトロトキシシン ( $\alpha$ -latrotoxin)、ニューレキソフィリン (neurexophilin)、それらのサブタイプまたはそれらの類縁体である第(9)項記載のリガンドの決定方法、
- 15 (20) リガンドが $\alpha$ -ラトロトキシシン ( $\alpha$ -latrotoxin)、ニューレキソフィリン (neurexophilin)、それらのサブタイプまたはそれらの類縁体である第(9)項記載のリガンドの決定方法、
- (21) (i) 第(1)項記載の蛋白質もしくはその塩または第(2)項記載の部分ペプチドもしくはその塩と、リガンドとを接触させた場合と、(ii) 第(1)項記載の蛋白質もしくはその塩または第(2)項記載の部分ペプチドもしくはその塩と、リガンドおよび試験化合物とを接触させた場合との比較を行なうことを特徴とする第(10)項記載のスクリーニング方法、
- 20 (22) (i) 標識したリガンドを第(1)項記載の蛋白質もしくはその塩または第(2)項記載の部分ペプチドもしくはその塩に接触させた場合と、(ii) 標識したリガンドおよび試験化合物を第(1)項記載の蛋白質もしくはその塩または第(3)項記載の部分ペプチドまたはその塩に接触させた場合における、標識したリガンドの第(1)項記載の蛋白質もし

くはその塩または第(2)項記載の部分ペプチドもしくはその塩に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと第(1)項記載の蛋白質またはその塩との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

5 (23) (i) 標識したリガンドを第(1)項記載の蛋白質を含有する細胞に接触させた場合と、(ii) 標識したリガンドおよび試験化合物を第(1)項記載の蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、標識したリガンドの該細胞に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと第(1)項記載の蛋白質またはその塩との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

10 (24) (i) 標識したリガンドを第(1)項記載の蛋白質を含有する細胞の膜画分に接触させた場合と、(ii) 標識したリガンドおよび試験化合物を第(1)項記載の蛋白質を含有する細胞の膜画分に接触させた場合における、標識したリガンドの該細胞の膜画分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと第(1)項記載の蛋白質またはその塩との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

15 (25) (i) 標識したリガンドを第(6)項記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現した蛋白質に接触させた場合と、(ii) 標識したリガンドおよび試験化合物を第(6)項記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現した蛋白質に接触させた場合における、標識したリガンドの該蛋白質に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと第(1)項記載の蛋白質またはその塩との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

20 (26) (i) 第(1)項記載の蛋白質またはその塩を活性化する化合物を第(1)項記載の蛋白質を含有する細胞に接触させた場合と、(ii) 第(1)項記載の蛋白質またはその塩を活性化する化合物および試験化合物を第(1)項記載の蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、蛋白質を介した細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とするリガンドと第(1)項記載の蛋白質またはその塩との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

25 (27) 第(1)項記載の蛋白質またはその塩を活性化する化合物を第(6)項記載の形質

転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現した蛋白質に接触させた場合と、第(1)項記載の蛋白質またはその塩を活性化する化合物および試験化合物を第(6)項記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現した蛋白質に接触させた場合における、該蛋白質を介する細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とするリガンドと第(1)項記載の蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(28) 第(1)項記載の蛋白質を活性化する化合物が、アンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、ブリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP (バソアクティブ インテスティナル アンド リレイテッド ポリペプチド)、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP (カルシトニンジーンリレーティッドペプチド)、ロイコトリエン、パングレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、 $\alpha$ および $\beta$ -ケモカイン (chemokine) (例えば、IL-8、GRO $\alpha$ 、GRO $\beta$ 、GRO $\gamma$ 、NAP-2、ENA-78、PF4、IP10、GCP-2、MCP-1、HC14、MCP-3、I-309、MIP1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、RANTESなど)、エンドセリン、エンテログASTリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パングレアティックポリペプチド、ガラニン、 $\alpha$ -ラトロトキシシン ( $\alpha$ -latrotoxin)、ニューレキソフィリン (neurexophilin)、それらのサブタイプまたはそれらの類縁体である第(26)項または第(27)項記載のスクリーニング方法、

(29) 第(1)項記載の蛋白質を活性化する化合物が、 $\alpha$ -ラトロトキシシン ( $\alpha$ -latrotoxin)、ニューレキソフィリン (neurexophilin)、それらのサブタイプまたはそれらの類縁体である第(26)項または第(27)項記載のスクリーニング方法、

(30) 第(21)項～第(28)項記載のスクリーニング方法で得られうる、リガンドと第(1)項記載の蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩、

(31) 第(21)項～第(28)項記載のスクリーニング方法で得られうる、リガンドと第(1)項記載の蛋白質またはその塩との結合性を变化させるの化合物またはその塩を含有することを特徴とする医薬、

(32) 第(1)項記載の蛋白質を含有する細胞を含有することを特徴とする第(11)項記載のスクリーニング用キット、

(33) 第(1)項記載の蛋白質を含有する細胞の膜画分を含有することを特徴とする第(11)項記載のスクリーニング用キット、

(34) 第(6)項記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現した蛋白質を含有することを特徴とする第(11)項記載のスクリーニング用キット、

(35) 第(32)項～第(34)項記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、リガンドと第(1)項記載の蛋白質またはその塩との結合性を变化させる化合物またはその塩、

(36) 第(32)項～第(34)項記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、リガンドと第(1)項記載の蛋白質またはその塩との結合性を变化させる化合物またはその塩を含有することを特徴とする医薬、

(37) 第(8)項記載の抗体と、第(1)項記載の蛋白質、第(2)項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩とを接触させることを特徴とする第(1)項の蛋白質、第(2)項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩の定量法、

(38) 第(8)項記載の抗体と、被検液および標識化された第(1)項記載の蛋白質、第(2)項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された第(1)項記載の蛋白質、第(2)項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩の割合を測定することを特徴とする被検液中の第(1)項記載の蛋白質、第(2)項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩の定量法、および

(39) 被検液と担体上に不溶化した第(8)項記載の抗体および標識化された第(8)項記載の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の第(1)項記載の蛋白質、第(2)項記載の部分ペプチド

またはそれらの塩の定量法などを提供する。

#### 図面の簡単な説明

図1は実施例1で得られた本発明のヒト脳由来蛋白質をコードするDNAの塩基配列、およびそれから推定されるアミノ酸配列を示す(図2に続く)。

図2は実施例1で得られた本発明のヒト脳由来蛋白質をコードするDNAの塩基配列、およびそれから推定されるアミノ酸配列を示す(図1の続き)。

図3は図1および図2に示したアミノ酸配列をもとに作成した、本発明のヒト脳由来蛋白質の疎水性プロットを示す。1~7で示した部分は疎水性ドメインを示す。

10 図4は実施例1で得られた本発明のヒト脳由来蛋白質をコードするDNAの塩基配列から推定されるアミノ酸配列(図中、HK05006 で表される配列)および実施例2で得られた本発明のヒト脳由来蛋白質をコードするDNAの塩基配列から推定されるアミノ酸配列(図中、HK05490 で表される配列)を示す(図5に続く)。

15 図5は実施例1で得られた本発明のヒト脳由来蛋白質をコードするDNAの塩基配列から推定されるアミノ酸配列(図中、HK05006 で表される配列)および実施例2で得られた本発明のヒト脳由来蛋白質をコードするDNAの塩基配列から推定されるアミノ酸配列(図中、HK05490 で表される配列)を示す(図4の続き)。

20 図6は実施例2で得られた本発明のヒト脳由来蛋白質をコードするDNAの塩基配列から推定されるアミノ酸配列をもとに作成した、本発明のヒト脳由来蛋白質の疎水性プロットを示す。1~7で示した部分は疎水性ドメインを示す。

図7は実施例2で得られた本発明のヒト脳由来蛋白質をコードするDNAの塩基配列、およびそれから推定されるアミノ酸配列を示す(図8に続く)。

図8は実施例2で得られた本発明のヒト脳由来蛋白質をコードするDNAの塩基配列、およびそれから推定されるアミノ酸配列を示す(図7の続き、図8に続く)。

25 図9は実施例2で得られた本発明のヒト脳由来蛋白質をコードするDNAの塩基配列、およびそれから推定されるアミノ酸配列を示す(図8の続き、図10に続く)。



図10は実施例2で得られた本発明のヒト脳由来蛋白質をコードするDNAの塩基配列、およびそれから推定されるアミノ酸配列を示す(図9の続き、図11に続く)。

図11は実施例2で得られた本発明のヒト脳由来蛋白質をコードするDNAの塩基配列、およびそれから推定されるアミノ酸配列を示す(図10の続き、図12に続く)。

5 図12は実施例2で得られた本発明のヒト脳由来蛋白質をコードするDNAの塩基配列、およびそれから推定されるアミノ酸配列を示す(図11の続き、図13に続く)。

図13は実施例2で得られた本発明のヒト脳由来蛋白質をコードするDNAの塩基配列、およびそれから推定されるアミノ酸配列を示す(図12の続き、図14に続く)。

10 図14は実施例2で得られた本発明のヒト脳由来蛋白質をコードするDNAの塩基配列、およびそれから推定されるアミノ酸配列を示す(図13の続き、図15に続く)。

図15は実施例2で得られた本発明のヒト脳由来蛋白質をコードするDNAの塩基配列、およびそれから推定されるアミノ酸配列を示す(図14の続き)。

図16は実施例1で得られた本発明のヒト脳由来蛋白質をコードするDNAの塩基配列から推定されるアミノ酸配列(図中、HK05006 で表される配列)、実施例2で得られた本発明  
15 のヒト脳由来蛋白質をコードするDNAの塩基配列から推定されるアミノ酸配列(図中、HK05490 で表される配列) および実施例3で得られた本発明のヒト脳由来蛋白質をコードするDNAの塩基配列から推定されるアミノ酸配列(図中、HH02631 で表される配列)を示す(図17に続く)。

図17は実施例1で得られた本発明のヒト脳由来蛋白質をコードするDNAの塩基配列から推定されるアミノ酸配列(図中、HK05006 で表される配列)、実施例2で得られた本発明  
20 のヒト脳由来蛋白質をコードするDNAの塩基配列から推定されるアミノ酸配列(図中、HK05490 で表される配列) および実施例3で得られた本発明のヒト脳由来蛋白質をコードするDNAの塩基配列から推定されるアミノ酸配列(図中、HH02631 で表される配列)を示す(図18に続く)。

25 図18は実施例1で得られた本発明のヒト脳由来蛋白質をコードするDNAの塩基配列から推定されるアミノ酸配列(図中、HK05006 で表される配列)、実施例2で得られた本発明

のヒト脳由来蛋白質をコードするDNAの塩基配列から推定されるアミノ酸配列（図中、HK05490 で表される配列）および実施例3で得られた本発明のヒト脳由来蛋白質をコードするDNAの塩基配列から推定されるアミノ酸配列（図中、HH02631 で表される配列）を示す（図19に続く）。

- 5 図19は実施例1で得られた本発明のヒト脳由来蛋白質をコードするDNAの塩基配列から推定されるアミノ酸配列（図中、HK05006 で表される配列）、実施例2で得られた本発明のヒト脳由来蛋白質をコードするDNAの塩基配列から推定されるアミノ酸配列（図中、HK05490 で表される配列）および実施例3で得られた本発明のヒト脳由来蛋白質をコードするDNAの塩基配列から推定されるアミノ酸配列（図中、HH02631 で表される配列）を示す  
10 （図20に続く）。

- 図20は実施例1で得られた本発明のヒト脳由来蛋白質をコードするDNAの塩基配列から推定されるアミノ酸配列（図中、HK05006 で表される配列）、実施例2で得られた本発明のヒト脳由来蛋白質をコードするDNAの塩基配列から推定されるアミノ酸配列（図中、HK05490 で表される配列）および実施例3で得られた本発明のヒト脳由来蛋白質をコードするDNAの塩基配列から推定されるアミノ酸配列（図中、HH02631 で表される配列）を示す  
15 （図19の続き）。

図21は実施例3で得られたプラスミドpHH02631に含有される塩基配列を示す（図22に続く）。

- 図22は実施例3で得られたプラスミドpHH02631に含有される塩基配列を示す（  
20 図23に続く）。

図23は実施例3で得られたプラスミドpHH02631に含有される塩基配列を示す（図24に続く）。

図24は実施例3で得られたプラスミドpHH02631に含有される塩基配列を示す（図23の続き）。

- 25 図25は実施例3で得られた本発明のヒト脳由来蛋白質をコードするDNAの塩基配列から推定されるアミノ酸配列をもとに作成した、本発明のヒト脳由来蛋白質の疎水性プロット

を示す。1～7で示した部分は疎水性ドメインを示す。

#### 発明を実施するための最良の形態

本発明の蛋白質（G蛋白質共役型レセプター蛋白質）は、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列〔図1および図2中のアミノ酸配列〕、配列番号：3で表わされるアミノ酸配列〔図4および図5中のHK05490で表されるアミノ酸配列；図7～図15中のアミノ酸配列〕または配列番号：5で表されるアミノ酸配列〔図16ないし図20中のHH02631で表されるアミノ酸配列〕と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質である（以下、本発明の蛋白質（G蛋白質共役型レセプター蛋白質）またはその塩を本発明の蛋白質と略記する場合がある）。

本発明の蛋白質（G蛋白質共役型レセプター蛋白質）は、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）のあらゆる細胞（例えば、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓β細胞、骨髄細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など）や血球系の細胞（例えば、MEL, M1, CTLL-2, HT-2, WEHI-3, HL-60, JOSK-1, K562, ML-1, MOLT-3, MOLT-4, MOLT-10, CCRF-CEM, TALL-1, Jurkat, CCRT-HSB-2, KE-37, SKW-3, HUT-78, HUT-102, H9, U937, THP-1, HEL, JK-1, CMK, KO-812, MEG-01など）、またはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位（例、嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、視床下核、大脳皮質、延髄、小脳、後頭葉、前頭葉、側頭葉、被殻、尾状核、脳梁、黒質）、脊髄、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管（例、大腸、小腸）、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎

下腺、末梢血、末梢血球、前立腺、睪丸、精巣、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋など（特に、脳や脳の各部位）に由来する蛋白質であってもよく、また合成蛋白質であってもよい。

配列番号：1、配列番号：3または配列番号：5で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、例えば、配列番号：1、配列番号：3または配列番号：5で表わされるアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

本発明の配列番号：1、配列番号：3または配列番号：5で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質としては、例えば、配列番号：1、配列番号：3または配列番号：5で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有し、配列番号：1、配列番号：3または配列番号：5で表わされるアミノ酸配列と実質的に同質の活性を有する蛋白質などが好ましい。

実質的に同質の活性としては、例えば、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などが挙げられる。実質的に同質とは、それらの活性が性質的に同質であることを示す。したがって、リガンド結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性が同等（例、約0.5～2倍）であることが好ましいが、これらの活性の程度や蛋白質の分子量などの量的要素は異なってもよい。

リガンド結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性の測定は、自体公知の方法に準じて行なうことができるが、例えば、後述するリガンドの決定方法やスクリーニング方法に従って測定することができる。

また、本発明の蛋白質としては、①配列番号：1、配列番号：3または配列番号：5で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1または2個））のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号：1、配列番号：3または配列番号：5で表わされるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好

ましくは数個（１または２個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号：１、配列番号：３または配列番号：５で表わされるアミノ酸配列中の１または２個以上（好ましくは、１～３０個程度、より好ましくは１～１０個程度、さらに好ましくは数個（１または２個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または④それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有する蛋白質なども用いられる。

本明細書における蛋白質は、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。配列番号：１、配列番号：３または配列番号：５で表わされるアミノ酸配列を含有する蛋白質をはじめとする、本発明の蛋白質は、C末端が通常カルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）またはカルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）であるが、C末端がアミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）であってもよい。

ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピルもしくは*n*-ブチルなどの $\text{C}_{1-6}$ アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの $\text{C}_{3-8}$ シクロアルキル基、例えば、フェニル、 $\alpha$ -ナフチルなどの $\text{C}_{6-12}$ アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル- $\text{C}_{1-2}$ アルキル基もしくは $\alpha$ -ナフチルメチルなどの $\alpha$ -ナフチル- $\text{C}_{1-2}$ アルキル基などの $\text{C}_{7-14}$ アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピバロイルオキシメチル基などが用いられる。

本発明の蛋白質がC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明の蛋白質に含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

さらに、本発明の蛋白質には、上記した蛋白質において、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などの $\text{C}_{1-6}$ アシル基など）で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミル基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{COOH}$ 、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などの $\text{C}_{1-6}$ アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖蛋白質などの複合蛋白質なども含まれる。

本発明の蛋白質の具体例としては、例えば、配列番号：1、配列番号：3または配列番号：5で表わされるアミノ酸配列を含有するヒト由来（より好ましくはヒト脳由来）の蛋白質などが用いられる。

本発明の蛋白質の部分ペプチド（以下、部分ペプチドと略記する場合がある）としては、  
5 前記した本発明の蛋白質の部分ペプチドであれば何れのものであってもよいが、例えば、本発明の蛋白質分子のうち、細胞膜の外に露出している部位であって、レセプター結合活性を有するものなどが用いられる。

具体的には、配列番号：1、配列番号：3または配列番号：5で表わされるアミノ酸配列を有する蛋白質の部分ペプチドとしては、〔図3〕、〔図6〕または〔図25〕で示される  
10 疎水性プロット解析において細胞外領域（親水性（Hydrophilic）部位）であると分析された部分を含むペプチドである。また、疎水性（Hydrophobic）部位を一部に含むペプチドも同様に用いることができる。個々のドメインを個別に含むペプチドも用い得るが、複数のドメインを同時に含む部分のペプチドでも良い。

本発明の部分ペプチドのアミノ酸の数は、前記した本発明の蛋白質の構成アミノ酸配列のうち少なくとも20個以上、好ましくは50個以上、より好ましくは100個以上のアミノ  
15 酸配列を有するペプチドなどが好ましい。

実質的に同一のアミノ酸配列とは、これらアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列を示す。

20 ここで、「実質的に同質の活性」とは、前記と同意義を示す。「実質的に同質の活性」の測定は前記と同様に行なうことができる。

また、本発明の部分ペプチドは、上記アミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、さらに好ましくは数個（1または2個））のアミノ酸が欠失し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～20個程度、より好ましくは1～  
25 10個程度、さらに好ましくは数個（1または2個））のアミノ酸が付加し、または、そのアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、より好ましくは1～5

個程度、さらに好ましくは数個（1または2個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されていてよい。

また、本発明の部分ペプチドはC末端が通常カルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）またはカルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）であるが、前記した本発明の蛋白質のごとく、C末端がアミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）であってもよい。

さらに、本発明の部分ペプチドには、前記した本発明の蛋白質と同様に、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したGlnがピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

また、本発明の部分ペプチドはC末端が通常カルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）またはカルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）であるが、前記した本発明の蛋白質のごとく、C末端がアミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）であってもよい。

本発明の蛋白質またはその部分ペプチドの塩としては、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

本発明の蛋白質またはその塩は、前述したヒトや哺乳動物の細胞または組織から自体公知の蛋白質の精製方法によって製造することもできるし、後述する本発明の蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後述の蛋白質合成法またはこれに準じて製造することもできる。

ヒトや哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行ない、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせることにより精製単離することができる。

本発明の蛋白質、その部分ペプチドもしくはそれらの塩またはそれらのアミド体の合成には、通常市販の蛋白質合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、

5 PAM 樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-Fmoc アミノエチル)フェノキシ樹脂などを挙げることができる。このような樹脂を用い、 $\alpha$ -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とする蛋白質の配列通りに、自体公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最

10 後に樹脂から蛋白質を切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的の蛋白質またはそれらのアミド体を取得する。

上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、蛋白質合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては、DCC、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロリル)カルボジイミド

15 などが用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤（例えば、HOBt、HOObt）とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対称酸無水物または HOBt エステルあるいは HOObt エステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行なった後に樹脂に添加することができる。

保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、蛋白質縮合反応に使用

20 しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、N,N-ジメチルホルムアミド、N,N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジン、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル

25 ル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度は蛋白質結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約



- −20℃〜50℃の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常1.5〜4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行うことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行なうことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することができる。

- 原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、ターシャリーベンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが用いられる。
- 10 カルボキシル基は、例えば、アルキルエステル化（例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、ターシャリーブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、2-アダマンチルなどの直鎖状、分枝状もしくは環状アルキルエステル化）、アラキルエステル化（例えば、ベンジルエステル、4-ニトロベンジルエステル、4-メトキシベンジルエステル、4-クロロベンジルエステル、ベンズヒドリルエステル化）、フェ
- 15 ナシルエステル化、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド化、ターシャリープトキシカルボニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化などによって保護することができる。

- セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの低級アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの
- 20 炭酸から誘導される基などが用いられる。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒドロピラニル基、t-ブチル基などである。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、Bzl、Cl<sub>2</sub>-Bzl、2-ニトロベンジル、Br-Z、ターシャリーブチルなどが用いられる。

- ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、Tos、4-メトキシ-2,3,6-トリメチルベンゼンスルホニル、DNP、ベンジルオキシメチル、Bum、Boc、Trt、Fmocなどが用いられる。
- 25

原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル〔アルコール（例えば、ペンタクロロフェノール、2,4,5-トリクロロフェノール、2,4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、N-ヒドロキシスクシミド、N-ヒドロキシフタルイミド、HOBt）とのエステル〕などが用いられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。

保護基の除去（脱離）方法としては、例えば、Pd-黒あるいはPd-炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども用いられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約 $-20^{\circ}\text{C}$ ～ $40^{\circ}\text{C}$ の温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1,4-ブタンジチオール、1,2-エタンジチオールなどのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2,4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1,2-エタンジチオール、1,4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。

蛋白質のアミド体を得る別の方法としては、例えば、まず、カルボキシ末端アミノ酸の $\alpha$ -カルボキシル基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド（蛋白質）鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の $\alpha$ -アミノ基の保護基のみを除いた蛋白質とC末端のカルボキシル基の保護基のみを除去した蛋白質とを製造し、この両蛋白質を上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合によ

り得られた保護蛋白質を精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗蛋白質を得ることができる。この粗蛋白質は既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望の蛋白質のアミド体を得ることができる。

5 蛋白質のエステル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミノ酸の $\alpha$ -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、蛋白質のアミド体と同様にして、所望の蛋白質のエステル体を得ることができる。

本発明の蛋白質の部分ペプチドまたはその塩は、自体公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明の蛋白質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。  
10 。すなわち、本発明の蛋白質を構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の①～⑤に記載された方法が挙げられる。

① M. Bodanszky および M. A. Ondetti、ペプチド シンセシス (Peptide Synthesis),  
15 Interscience Publishers, New York (1966 年)

② Schroeder および Luebke、ザ ペプチド (The Peptide), Academic Press, New York (1965 年)

③ 泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975 年)

④ 矢島治明 および 榊原俊平、生化学実験講座 1、蛋白質の化学 IV、205、(1977 年)

20 ⑤ 矢島治明監修、続医薬品の開発 第14巻 ペプチド合成 広川書店

また、反応後は通常の精製法、たとえば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明の部分ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られる部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離  
25 体に変換することができる。

本発明の蛋白質をコードするDNAとしては、前述した本発明の蛋白質をコードする塩基

配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、  
5 前記した細胞・組織より total RNAまたはmRNA画分を調製したものをを用いて直接 Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下、RT-PCR法と略称する) によって増幅することもできる。

具体的には、本発明の蛋白質をコードするDNAとしては、例えば、配列番号：2、配列番号：4または配列番号：6で表わされる塩基配列を含有するDNA、または配列番号：2  
10 、配列番号：4または配列番号：6で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明の蛋白質と実質的に同質の活性（例、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用など）を有する蛋白質をコードするDNAであれば何れのものでもよい。

配列番号：2、配列番号：4または配列番号：6で表わされる塩基配列とハイブリダイズ  
15 できるDNAとしては、例えば、配列番号：2、配列番号：4または配列番号：6で表わされる塩基配列と約70以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor  
20 Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行なうことができる。

ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約19～40mM、好ましくは約19～20mMで、温度が約50～70℃、好ましくは約60～65℃の条件を示す  
25 。特に、ナトリウム濃度が約19mMで温度が約65℃の場合が最も好ましい。

より具体的には、配列番号：1、配列番号：3または配列番号：5で表わされるアミノ酸

配列を含有する蛋白質をコードするDNAとしては、配列番号：2、配列番号：4または配列番号：6で表わされる塩基配列を有するDNAなどが用いられる。

本発明の蛋白質をコードする塩基配列を含有する、または該塩基配列と相補的な塩基配列の一部を含有してなるヌクレオチド（オリゴヌクレオチド）とは、本発明の蛋白質またはその部分ペプチドをコードするDNAを包含するだけではなく、RNAをも包含する意味で用いられる。

本発明に従えば、本発明の蛋白質遺伝子の複製又は発現を阻害することのできるアンチセンス・（オリゴ）ヌクレオチド（核酸）を、クローン化したあるいは決定された蛋白質をコードする塩基配列の塩基配列情報に基づき設計し、合成しうる。そうした（オリゴ）ヌクレオチド（核酸）は、G蛋白質共役型蛋白質遺伝子のRNAとハイブリダイズすることができ、該RNAの合成又は機能を阻害することができるか、あるいはG蛋白質共役型蛋白質関連RNAとの相互作用を介してG蛋白質共役型蛋白質遺伝子の発現を調節・制御することができる。G蛋白質共役型蛋白質関連RNAの選択された配列に相補的な（オリゴ）ヌクレオチド、及びG蛋白質共役型蛋白質関連RNAと特異的にハイブリダイズすることができる（オリゴ）ヌクレオチドは、生体内及び生体外でG蛋白質共役型蛋白質遺伝子の発現を調節・制御するのに有用であり、また病気などの治療又は診断に有用である。

用語「対応する」とは、遺伝子を含めたヌクレオチド、塩基配列又は核酸の特定の配列に同一性を有するあるいは相補的であることを意味する。ヌクレオチド、塩基配列又は核酸とペプチド（蛋白質）との間で「対応する」とは、ヌクレオチド（核酸）の配列又はその相補体から誘導される指令にあるペプチド（蛋白質）のアミノ酸を通常指している。G蛋白質共役型蛋白質遺伝子の5'端ヘアピンループ、5'端6-ベースペア・リピート、5'端非翻訳領域、ポリペプチド翻訳開始コドン、蛋白質コード領域、ORF翻訳開始コドン、3'端非翻訳領域、3'端パリンドローム領域、及び3'端ヘアピンループは好ましい対象領域として選択しうるが、G蛋白質共役型蛋白質遺伝子内の如何なる領域も対象として選択しうる。

目的核酸と、対象領域の少なくとも一部に相補的な（オリゴ）ヌクレオチドとの関係は、

対象物とハイブリダイズすることができる（オリゴ）ヌクレオチドとの関係は、「アンチセンス」であるということができる。アンチセンス・（オリゴ）ヌクレオチドは、2-デオキシ-D-リボースを含有しているポリデオキシヌクレオチド、D-リボースを含有しているポリデオキシヌクレオチド、プリン又はピリミジン塩基のN-グリコシドであるその他のタイプのポリヌクレオチド、あるいは非ヌクレオチド骨格を有するその他のポリマー（例えば、市販の蛋白質核酸及び合成配列特異的な核酸ポリマー）又は特殊な結合を含有するその他のポリマー（但し、該ポリマーはDNAやRNA中に見出されるような塩基のペアリナグや塩基の付着を許容する配置をもつヌクレオチドを含有する）などが挙げられる。それらは、2本鎖DNA、1本鎖DNA、2本鎖RNA、1本鎖RNA、さらにDNA:RNAハイブリッドであることができ、さらに非修飾ポリヌクレオチド又は非修飾オリゴヌクレオチド、さらには公知の修飾の付加されたもの、例えば当該分野で知られた標識のあるもの、キャップの付いたもの、メチル化されたもの、1個以上の天然のヌクレオチドを類縁物で置換したもの、分子内ヌクレオチド修飾のされたもの、例えば非荷電結合（例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホルアミデート、カルバメートなど）を持つもの、電荷を有する結合又は硫黄含有結合（例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど）を持つもの、例えば蛋白質（ヌクレアーゼ、ヌクレアーゼ・インヒビター、トキシン、抗体、シグナルペプチド、ポリ-ラージンなど）や糖（例えば、モノサッカライドなど）などの側鎖基を有しているもの、インターカレント化合物（例えば、アクリジン、プソラレンなど）を持つもの、キレート化合物（例えば、金属、放射活性をもつ金属、ホウ素、酸化性の金属など）を含有するもの、アルキル化剤を含有するもの、修飾された結合を持つもの（例えば、 $\alpha$ アノマー型の核酸など）であってもよい。ここで「ヌクレオシド」、「ヌクレオチド」及び「核酸」とは、項とのプリン及びピリミジン塩基を含有するのみでなく、修飾されたその他の複素環型塩基をもつようなものを含んでいて良い。こうした修飾物は、メチル化されたプリン及びピリミジン、アシル化されたプリン及びピリミジン、あるいはその他の複素環を含むものであってよい。修飾されたヌクレオチド及び修飾されたヌクレオチドはまた糖部分が修飾されていてよく、例えば1個以上の水酸基がハロゲンとか、脂肪族基などで置

換されていたり、あるいはエーテル、アミンなどの官能基に変換されていてよい。

本発明のアンチセンス核酸は、RNA、DNA、あるいは修飾された核酸である。修飾された核酸の具体例としては核酸の硫黄誘導体やチオホスフェート誘導体、そしてポリヌクレオシドアミドやオリゴヌクレオシドアミドの分解に抵抗性のものが挙げられるが、それに限定されるものではない。本発明のアンチセンス核酸は次のような方針で好ましく設計される。すなわち、細胞内でのアンチセンス核酸をより安定なものにする、アンチセンス核酸の細胞透過性をより高める、目標とするセンス鎖に対する親和性をより大きなものにする、そしてもし毒性があるならアンチセンス核酸の毒性をより小さなものにする。

こうして修飾は当該分野で数多く知られており。例えば J. Kawakami et al., Pharm Tech Japan, Vol. 8, pp. 247, 1992; Vol. 8, pp. 395, 1992; S. T. Crooke et al. ed., Antisense Research and Applications, CRC Press, 1993 などに開示がある。

本発明のアンチセンス核酸は、変化せしめられたり、修飾された糖、塩基、結合を含有していて良く、リボソーム、ミクロスフェアのような特殊な形態で供与されたり、遺伝子治療により適用されたり、付加された形態で与えられることができる。こうして付加形態で用いられるものとしては、リン酸基骨格の電荷を中和するように働くポリリジンのようなポリカチオン体、細胞膜との相互作用を高めたり、核酸の取込みを増大せしめるような脂質（例えば、ホスホリッピド、コレステロールなど）といった粗水性のものが挙げられる。付加するに好ましい脂質としては、コレステロールやその誘導体（例えば、コレステリルクロホルメート、コール酸など）が挙げられる。こうしたものは、核酸の3' 端あるいは5' 端に付着させることができ、塩基、糖、分子内ヌクレオシド結合を介して付着させることができる。その他の基としては、核酸の3' 端あるいは5' 端に特異的に配置されたキャップ用の基で、エキソヌクレアーゼ、RNAseなどのヌクレアーゼによる分解を阻止するためのものが挙げられる。こうしたキャップ用の基としては、ポリエチレングリコール、テトラエチレングリコールなどのグリコールをはじめとした当該分野で知られた水酸基の保護基が挙げられるが、それに限定されるものではない。

アンチセンス核酸の阻害活性は、本発明の形質転換体、本発明の生体内や生体外の遺伝子

発現系、あるいは蛋白質の生体内や生体外の翻訳系を用いて調べることができる。該核酸其れ自体公知の各種の方法で細胞に適用できる。

本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、前述した本発明の部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織よりmRNA画分を調製したものを用いて直接 Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下、RT-PCR法と略称する) によって増幅することもできる。

具体的には、本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、例えば、配列番号：2、配列番号：4または配列番号：6で表わされる塩基配列を有するDNAの部分塩基配列を有するDNA、または②配列番号：2、配列番号：4または配列番号：6で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明の蛋白質ペプチドと実質的に同質の活性（例、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用など）を有する蛋白質をコードするDNAの部分塩基配列を有するDNAなどが用いられる。

配列番号：2、配列番号：4または配列番号：6で表わされる塩基配列ハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：2、配列番号：4または配列番号：6で表わされる塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

本発明の蛋白質またはその部分ペプチド（以下、本発明の蛋白質と略記する）を完全にコードするDNAのクローニングの手段としては、本発明の蛋白質の部分塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNAを本発明の蛋白質の一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したものとのハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning



2 nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。

5 DNAの塩基配列の変換は、公知のキット、例えば、Mutant<sup>TM</sup>-G (宝酒造 (株))、Mutant<sup>TM</sup>-K (宝酒造 (株)) などを用いて、Gapped duplex 法や Kunkel 法などの自体公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行なうことができる。

クローン化された蛋白質をコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

本発明の蛋白質の発現ベクターは、例えば、(イ) 本発明の蛋白質をコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(ロ) 該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

15 ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド (例、pBR322, pBR325, pUC12, pUC13)、枯草菌由来のプラスミド (例、pUB110, pTP5, pC194)、酵母由来プラスミド (例、pSH19, pSH15)、λファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどの他、pA1-11, pXT1, pRc/CMV, pRc/RSV, pcDNA1/Neo  
20 などが用いられる。

本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SRαプロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターなどが挙げられる。

25 これらのうち、CMVプロモーター、SRαプロモーターなどを用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recA

プロモーター、 $\lambda$  P L プロモーター、l p p プロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、S P O 1 プロモーター、S P O 2 プロモーター、p e n P プロモーターなど、宿主が酵母である場合は、P H O 5 プロモーター、P G K プロモーター、G A P プロモーター、A D H プロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P 1 0 プロモーターなどが好ましい。

発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、S V 4 0 複製オリジン（以下、S V 4 0 o r i と略称する場合がある）などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、d h f r と略称する場合がある）遺伝子〔メソトレキセート（M T X）耐性〕、アンピシリン耐性遺伝子（以下、A m p<sup>r</sup> と略称する場合がある）、ネオマイシン耐性遺伝子（以下、N e o と略称する場合がある、G 4 1 8 耐性）等が挙げられる。特に、C H O（d h f r<sup>-</sup>）細胞を用いてd h f r 遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子をチミジンを含まない培地によっても選択できる。

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明の蛋白質のN端末側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、P h o A ・シグナル配列、O m p A ・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、 $\alpha$ -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、M F  $\alpha$  ・シグナル配列、S U C 2 ・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、 $\alpha$ -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

このようにして構築された本発明の蛋白質をコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌の具体例としては、エシェリヒア・コリ（*Escherichia coli*）K 1 2 ・D H 1 〔プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー（*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*）, 6 0 巻, 1 6 0（1 9 6 8）〕

], JM103 [ヌクレック・アシックス・リサーチ, (Nucleic Acids Research), 9巻, 309(1981)], JA221 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology)], 120巻, 517(1978)], HB101 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41巻, 459(1969)], C600 [ジェネティックス (Genetics), 39巻, 440(1954)] などが用いられる。

バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サチルス (*Bacillus subtilis*) MI114 [ジーン, 24巻, 255(1983)], 207-21 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry), 95巻, 87(1984)] などが用いられる。

酵母としては、例えば、サッカロマイセス セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) A H22, AH22R<sup>-</sup>, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12、シゾサッカロマイセス ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) NCYC1913, NCYC2036、ピキア パストリス (*Pichia pastoris*) などが用いられる。

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (*Spodoptera frugiperda* cell; Sf細胞)、*Trichoplusia ni* の中腸由来のMG1細胞、  
15 *Trichoplusia ni* の卵由来のHigh Five<sup>TM</sup>細胞、*Mamestra brassicae* 由来の細胞または *Estigmene acrea* 由来の細胞などが用いられる。ウイルスがBmNPVの場合は、蚕由来株化細胞 (*Bombyx mori* N; BmN細胞) などが用いられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞 (ATCC CRL1711)、Sf21細胞 (以上、Vaughn, J.L. ら、イン・ヴィボ (In Vivo), 13, 213-217, (1977)) などが用いられる。

20 昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる [前田ら、ネイチャー (Nature), 315巻, 592(1985)]。

動物細胞としては、例えば、サル細胞COS-7, Vero, チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO細胞と略記)、dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO(dhfr<sup>-</sup>)細胞と略記)、マウスL細胞、マウスAtT-20、マウスミエローマ細胞、ラットGH3、ヒトFL細胞などが用いられる。

25 エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル

ル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 69巻, 2110(1972)やジーン (Gene), 17巻, 107(1982)などに記載の方法に従って行なうことができる。バチルス属菌を形質転換するには、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティックス (Molecular & General Genetics) 5), 168巻, 111(1979)などに記載の方法に従って行なうことができる。

酵母を形質転換するには、例えば、メソズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology), 194巻, 182-187(1991)、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 75巻, 1929(1978)などに記載の方法に従って行なうことができる。 10

昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、バイオテクノロジー (Bio/Technology), 6, 47-55(1988)などに記載の方法に従って行なうことができる。

動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊8 新 細胞工学実験プロトコル, 263-267(1995) (秀潤社発行)、ヴィロロジー (Virology), 52巻, 45 15 6(1973)に記載の方法に従って行なうことができる。

このようにして、G蛋白質共役型蛋白質をコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体が得られる。

宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5~8が望ましい。 20 25

エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含む

M9培地〔ミラー (Miller) , ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス (Journal of Experiments in Molecular Genetics) , 431-433 , Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972〕が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、3β-インドリル アクリル酸のような薬剤を加えることができる。宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15~43℃で約3~24時間行ない、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30~40℃で約6~24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、バークホルダー (Burkholder) 最小培地 [Bostian, K. L. ら、"Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America" (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) , 77巻, 4505 (1980)] や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地 [Bitter, G. A. ら、"Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America" (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) , 81巻, 5330 (1984)] が挙げられる。培地のpHは約5~8に調整するのが好ましい。培養は通常約20℃~35℃で約24~72時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T. C. C., ネイチャー (Nature) , 195, 788 (1962)) に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは約6.2~6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃で約3~5日間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約5~20%の胎児牛血清を含むMEM培地 [サイエンス (Science) , 122巻, 501 (1952)] , DMEM培地 [ヴィロロジー (Virology) , 8巻, 396 (1959)] , RPMI 1640培地 [ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association) 199巻, 519 (1967)] , 199培地 [プロシージ

ング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオリジカル・メディシン (Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73巻, 1(1950)) などが用いられる。pHは約6~8であるのが好ましい。培養は通常約30℃~40℃で約15~60時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

- 5     以上のようにして、形質転換体の細胞膜に本発明のG蛋白質共役型蛋白質を生成せしめることができる。

上記培養物から本発明の蛋白質を分離精製するには、例えば、下記の方法により行なうことができる。

- 10     本発明の蛋白質を培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび/または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過により蛋白質の粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白質変性剤や、トリトンX-100<sup>TM</sup>などの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中に蛋白質が分泌される場合には、培養終了後、それ自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清
- 15     とを分離し、上清を集める。

- このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれる蛋白質の精製は、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈殿法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用す
- 20     る方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

- かくして得られる蛋白質が遊離体で得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準
- 25     じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。

なお、組換え体が産生する蛋白質を、精製前または精製後に適当な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

- 5      かくして生成する本発明の蛋白質またはその塩の活性は、標識したリガンドとの結合実験および特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイなどにより測定することができる。

本発明の蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩に対する抗体は、本発明の蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩を認識し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであつてもよい。

- 10     本発明の蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩（以下、本発明の蛋白質等と略記する）に対する抗体は、本発明の蛋白質等を抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

〔モノクローナル抗体の作製〕

（a）モノクローナル抗体産生細胞の作製

- 15     本発明の蛋白質等は、哺乳動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行なわれる。用いられる哺乳動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギが挙げられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。
- 20

- モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原を免疫された温血動物、例えば、マウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、
- 25     後記の標識化した本発明の蛋白質等と抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行なうことができる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラー

とミルスタインの方法〔ネイチャー (Nature)、256巻、495頁(1975年)〕に従い実施することができる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール (PEG) やセンダイウィルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。

5 骨髄腫細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/0などが挙げられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞 (脾臓細胞) 数と骨髄腫細胞数との好ましい比率は1:1~20:1程度であり、PEG (好ましくは、PEG1000~PEG6000) が10~80%程度の濃度で添加され、約20~40℃、好ましくは約30~37℃で約1~10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、  
10 、例えば、本発明の蛋白質等抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相 (例、マイクロプレート) にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体 (細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる) またはプロテインAを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培  
15 養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識した本発明の蛋白質等を加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などが挙げられる。

モノクローナル抗体の選別は、自体公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができるが、通常はHAT (ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン) を添加した動物細胞用培地などで行なうことができる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生  
20 育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1~20%、好ましくは10~20%の牛胎児血清を含むRPMI 1640培地、1~10%の牛胎児血清を含むGIT培地 (和光純薬工業 (株)) またはハイブリドーマ培養用無血清培地 (SFM-101、日水製薬 (株)) などを用いることができる。培養温度は、通常20~40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日~3週間、好ましくは1週間~2週間である。培養  
25 は、通常5%炭酸ガス下で行なうことができる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。



(b) モノクローナル抗体の精製

モノクローナル抗体の分離精製は、通常のポリクローナル抗体の分離精製と同様に免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例、DEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相またはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法〕に従って行なうことができる。

〔ポリクローナル抗体の作製〕

本発明のポリクローナル抗体は、それ自体公知あるいはそれに準じる方法にしたがって製造することができる。例えば、免疫抗原（レセプター蛋白質等抗原）とキャリアー蛋白質との複合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に哺乳動物に免疫を行ない、該免疫動物から本発明の蛋白質等に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造できる。

哺乳動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアー蛋白質との複合体に関し、キャリアー蛋白質の種類およびキャリアーとハプテンとの混合比は、キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、どのようなものをどのような比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミン、ウシサイログロブリン、キーホール・リンペット・ヘモシアニン等を重量比でハプテン1に対し、約0.1～20、好ましくは約1～5の割合でカプルさせる方法が用いられる。

また、ハプテンとキャリアーのカプリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオビリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。

縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常約2～6週毎に1回ずつ、計約3～10回程度行なうことができる。

ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された哺乳動物の血液、腹水など、好ましくは

血液から採取することができる。

抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。

- 5      本発明の蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩、およびそれらをコードするDNAは、①本発明の蛋白質に対するリガンドの決定方法、②抗体および抗血清の入手、③組換え型蛋白質の発現系の構築、④同発現系を用いたレセプター結合アッセイ系の開発と医薬品候補化合物のスクリーニング、⑤構造的に類似したリガンド・レセプターとの比較にもとづいたドラッグデザインの実施、⑥遺伝子診断におけるプローブやPCRプライマーを作成する  
10      ための試薬、⑦トランスジェニック動物の作製または⑧遺伝子予防・治療剤等の医薬などとして用いることができる。

- 特に、本発明の組換え型蛋白質の発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、ヒトや哺乳動物に特異的なG蛋白質共役型レセプターに対するリガンドの結合性を変化させる化合物（例、アゴニスト、アンタゴニストなど）をスクリーニングすることが  
15      でき、該アゴニストまたはアンタゴニストを各種疾病の予防・治療剤などとして使用することができる。

- 本発明の蛋白質、部分ペプチドまたはそれらの塩（以下、本発明の蛋白質等と略記する場合がある）、本発明の蛋白質またはその部分ペプチドをコードするDNA（以下、本発明のDNAと略記する場合がある）および本発明の蛋白質等に対する抗体（以下、本発明の抗体  
20      と略記する場合がある）の用途について、以下に具体的に説明する。

（1）本発明の蛋白質に対するリガンド（アゴニスト）の決定方法

本発明の蛋白質もしくはその塩または本発明の部分ペプチドもしくはその塩は、本発明の蛋白質またはその塩に対するリガンド（アゴニスト）を探索し、または決定するための試薬として有用である。

- 25      すなわち、本発明は、本発明の蛋白質もしくはその塩または本発明の部分ペプチドもしくはその塩と、試験化合物とを接触させることを特徴とする本発明の蛋白質に対するリガンド

の決定方法を提供する。

試験化合物としては、公知のリガンド（例えば、アンギオテンシン、ボンベシン、カナビ  
ノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、  
オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP、セクレチン、グルカゴ  
5 ィン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、  
GRP、PTH、VIP（バソアクティブ インテスティナル アンド リレイテッド ポ  
リペプチド）、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGR  
P（カルシトニンジーンリレーティッドペプチド）、ロイコトリエン、パンクレアスタチン  
、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、 $\alpha$ および $\beta$ -ケモカ  
10 イン（chemokine）（例えば、IL-8、GRO $\alpha$ 、GRO $\beta$ 、GRO $\gamma$ 、NAP-2、EN  
A-78、PF4、IP10、GCP-2、MCP-1、HC14、MCP-3、I-30  
9、MIP1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、RANTESなど）、エンドセリン、エンテログアストリン  
、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプチド、ガラニン  
など）、それらのサブタイプまたはそれらの類縁体の他に、公知の $\alpha$ -ラトロトキシ（ $\alpha$ -  
15 -latrotoxin）、ニューレキソフィリン（neurexophilin）、それらのサブタイプまたはそれ  
らの類縁体などがあげられ、またその他に、例えば、ヒトまたは哺乳動物（例えば、マウス  
、ラット、ブタ、ウシ、ヒツジ、サルなど）の組織抽出物、細胞培養上清などが用いられる  
。例えば、該組織抽出物、細胞培養上清などを本発明の蛋白質に添加し、細胞刺激活性など  
を測定しながら分画し、最終的に単一のリガンドを得ることができる。なかでも、 $\alpha$ -ラト  
20 ロトキシ（ $\alpha$ -latrotoxin）、ニューレキソフィリン（neurexophilin）、それらのサブタ  
イプまたはそれらの類縁体などが好ましいリガンドとしてあげられる。

具体的には、本発明のリガンド決定方法は、本発明の蛋白質、その部分ペプチドもしくは  
それらの塩を用いるか、または組換え型蛋白質の発現系を構築し、該発現系を用いたレセプ  
ター結合アッセイ系を用いることによって、本発明の蛋白質に結合して細胞刺激活性（例え  
25 ば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca<sup>2+</sup>遊離、細胞内cAMP生成、  
細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化

、c-fos活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性)を有する化合物(例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など)またはその塩を決定する方法である。

本発明のリガンド決定方法においては、本発明の蛋白質またはその部分ペプチドと試験化合物とを接触させた場合の、例えば、該蛋白質または該部分ペプチドに対する試験化合物の結合量や、細胞刺激活性などを測定することを特徴とする。

より具体的には、本発明は、①標識した試験化合物を、本発明の蛋白質もしくはその塩または本発明の部分ペプチドもしくはその塩に接触させた場合における、標識した試験化合物の該蛋白質もしくはその塩、または該部分ペプチドもしくはその塩に対する結合量を測定することを特徴とする本発明の蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法、

②標識した試験化合物を、本発明の蛋白質を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識した試験化合物の該細胞または該膜画分に対する結合量を測定することを特徴とする本発明の蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法、

③標識した試験化合物を、本発明の蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した蛋白質に接触させた場合における、標識した試験化合物の該蛋白質またはその塩に対する結合量を測定しすることを特徴とする本発明の蛋白質に対するリガンドの決定方法、

④試験化合物を、本発明の蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、蛋白質を介した細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $Ca^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など)を測定することを特徴とする本発明の蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法、および

⑤試験化合物を、本発明の蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した蛋白質に接触させた場合における、蛋白質を介する細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $Ca^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP

P生成、細胞内c GMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c - f o sの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性などを測定することを特徴とする本発明の蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法を提供します。

- 5      特に、上記①～③の試験を行ない、試験化合物が本発明の蛋白質に結合することを確認した後、上記④～⑤の試験を行なうことが好ましい。

まず、リガンド決定方法に用いる蛋白質としては、前記した本発明の蛋白質または本発明の部分ペプチドを含有するものであれば何れのものであってもよいが、動物細胞を用いて大量発現させた蛋白質が適している。

- 10      本発明の蛋白質を製造するには、前述の発現方法が用いられるが、該蛋白質をコードするDNAを哺乳動物細胞や昆虫細胞で発現することにより行なうことが好ましい。目的とする蛋白質部分をコードするDNA断片には、通常、相補DNAが用いられるが、必ずしもこれに制約されるものではない。例えば、遺伝子断片や合成DNAを用いてもよい。本発明の蛋白質をコードするDNA断片を宿主動物細胞に導入し、それらを効率よく発現させるために
- 15      は、該DNA断片を昆虫を宿主とするバキュロウイルスに属する核多角体病ウイルス（nuclear polyhedrosis virus ; NPV）のポリヘドリンプロモーター、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒトヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SR $\alpha$ プロモーターなどの下流に組み込むのが好ましい。発現したレセプターの量と質の検査はそれ自体公知の方法で行うことができる。例えば、文献〔Nambi, P. ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー（J. Biol. Chem.）, 267 巻, 19555～19559 頁, 1992 年〕に記載の方法に従って行
- 20      うことができる。

- したがって、本発明のリガンド決定方法において、本発明の蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩を含有するものとしては、それ自体公知の方法に従って精製した蛋白質、そ
- 25      の部分ペプチドまたはそれらの塩であってもよいし、該蛋白質を含有する細胞またはその細胞膜画分を用いてもよい。

本発明のリガンド決定方法において、本発明の蛋白質を含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法はそれ自体公知の方法に従って行なうことができる。

- 本発明の蛋白質を含有する細胞としては、本発明の蛋白質を発現した宿主細胞をいうが、
- 5 該宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが用いられる。

- 細胞膜画分としては、細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem 型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン (Kinematica 社製) による破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速 (500 rpm ~ 3000 rpm) で短時間 (通常、約1分~10分) 遠心し、上清をさらに高速 (15000 rpm ~ 30000 rpm) で通常30分~2時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現した蛋白質と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多
- 10
- 15 含まれる。

該蛋白質を含有する細胞やその膜画分中の蛋白質の量は、1細胞当たり  $10^3 \sim 10^8$  分子であるのが好ましく、 $10^5 \sim 10^7$  分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性 (比活性) が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

- 20 本発明の蛋白質またはその塩に対するリガンドを決定する前記の①~③の方法を実施するためには、適当な蛋白質画分と、標識した試験化合物が必要である。

蛋白質画分としては、天然型のレセプター蛋白質画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型レセプター画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などを示す。

- 25 標識した試験化合物としては、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$  などで標識したアンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、

- セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP（バソアクティブインテスティナル アンド リイテッド ポリペプチド）、ソマトスタチン、ドーパミン、
- 5 モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP（カルシトニンジーンリレーティッドペプチド）、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、 $\alpha$ および $\beta$ -ケモカイン（chemokine）（例えば、IL-8、GRO $\alpha$ 、GRO $\beta$ 、GRO $\gamma$ 、NAP-2、ENA-78、PF4、IP10、GCP-2、MCP-1、HC14、MCP-3、I-309、MIP1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、RANTES
- 10 など）、エンドセリン、エンテロガストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプチド、ガラニン、 $\alpha$ -ラトロトキシシン（ $\alpha$ -latrotoxin）、ニューレキシフィリン（neurexophilin）、それらのサブタイプまたはそれらの類縁体などが好適である。なかでも $\alpha$ -ラトロトキシシン（ $\alpha$ -latrotoxin）、ニューレキシフィリン（neurexophilin）、それらのサブタイプまたはそれらの類縁体などが好ましく用いられる。
- 15 具体的には、本発明の蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法を行なうには、まず本発明の蛋白質を含有する細胞または細胞の膜画分を、決定方法に適したバッファーに懸濁することによりレセプター標品を調製する。バッファーには、pH4~10（望ましくはpH6~8）のリン酸バッファー、トリス-塩酸バッファーなどのリガンドと本発明の蛋白質との結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減さ
- 20 せる目的で、CHAPS、Tween-80<sup>TM</sup>（花王-アトラス社）、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤やウシ血清アルブミンやゼラチンなどの各種蛋白質をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによるレセプターやリガンドの分解を抑える目的でPMSF、ロイペプチン、E-64（ペプチド研究所製）、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01ml~10mlの該レセプター溶液
- 25 に、一定量（5000cpm~500000cpm）の〔<sup>3</sup>H〕、〔<sup>125</sup>I〕、〔<sup>14</sup>C〕、〔<sup>35</sup>S〕などで標識した試験化合物を共存させる。非特異的結合量（NSB）を知る

ために大過剰の未標識の試験化合物を加えた反応チューブも用意する。反応は約0℃から50℃、望ましくは約4℃から37℃で、約20分から24時間、望ましくは約30分から3時間行なう。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターあるいはγ-カウンターで計測する。全結合量(B)から非特異的結合量(NSB)を引いたカウント(B-NSB)が0 cpmを越える試験化合物を本発明の蛋白質またはその塩に対するリガンド(アゴニスト)として選択することができる。

本発明の蛋白質またはその塩に対するリガンドを決定する前記の④～⑤の方法を実施するためには、該蛋白質を介する細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca<sup>2+</sup>遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など)を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。具体的には、まず、本発明の蛋白質を含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。リガンド決定を行なうにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質(例えば、アラキドン酸など)の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、cAMP産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。

本発明の蛋白質またはその塩に結合するリガンド決定用キットは、本発明の蛋白質もしくはその塩、本発明の部分ペプチドもしくはその塩、本発明の蛋白質を含有する細胞、または本発明の蛋白質を含有する細胞の膜画分などを含有するものである。

本発明のリガンド決定用キットの例としては、次のものが挙げられる。

#### 1. リガンド決定用試薬



①測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution (ギブコ社製) に、0.05%のウシ血清アルブミン (シグマ社製) を加えたもの。

孔径0.45  $\mu$ mのフィルターで濾過滅菌し、4℃で保存するか、あるいは用時調製しても  
5 良い。

②G蛋白質共役型レセプター蛋白質標品

本発明の蛋白質を発現させたCHO細胞を、12穴プレートに $5 \times 10^5$ 個/穴で継代し、37℃、5%CO<sub>2</sub>、95%airで2日間培養したもの。

③標識試験化合物

10 市販の [<sup>3</sup>H]、[<sup>125</sup>I]、[<sup>14</sup>C]、[<sup>35</sup>S] などと標識した化合物、または適当な方法で標識化したもの

水溶液の状態のものを4℃あるいは-20℃にて保存し、用時に測定用緩衝液にて1  $\mu$ Mに希釈する。水に難溶性を示す試験化合物については、ジメチルホルムアミド、DMSO、メタノール等に溶解する。

15 ④非標識試験化合物

標識化合物と同じものを100～1000倍濃い濃度に調製する。

2. 測定法

①12穴組織培養用プレートにて培養した本発明の蛋白質発現CHO細胞を、測定用緩衝液1mlで2回洗浄した後、490  $\mu$ lの測定用緩衝液を各穴に加える。

20 ②標識試験化合物を5  $\mu$ l加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るためには非標識試験化合物を5  $\mu$ l加えておく。

③反応液を除去し、1mlの洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識試験化合物を0.2N NaOH-1%SDSで溶解し、4mlの液体シンチレーターA (和光純薬製) と混合する。

25 ④液体シンチレーションカウンター (ベックマン社製) を用いて放射活性を測定する。

本発明の蛋白質またはその塩に結合することができるリガンドとしては、例えば、脳、下

垂体、膵臓などに特異的に存在する物質などが挙げられ、具体的には、アンギオテンシン、  
ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニ  
ューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP、セ  
クレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、  
5 CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP（バソアクティブ インテスティナル アンド  
リレイテッド ポリペプチド）、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラ  
ジキニン、CGRP（カルシトニンジーンリレーティッドペプチド）、ロイコトリエン、パ  
ンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、 $\alpha$   
および $\beta$ -ケモカイン（chemokine）（例えば、IL-8、GRO $\alpha$ 、GRO $\beta$ 、GRO $\gamma$ 、  
10 NAP-2、ENA-78、PF4、IP10、GCP-2、MCP-1、HC14、MC  
P-3、I-309、MIP1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、RANTESなど）、エンドセリン、エ  
ンテログストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペ  
プチド、ガラニン、 $\alpha$ -ラトロトキシシン（ $\alpha$ -latrotoxin）、ニューレキソフィリン（  
neurexophilin）、それらのサブタイプまたはそれらの類縁体などが用いられる。なかでも $\alpha$ -  
15 ラトロトキシシン（ $\alpha$ -latrotoxin）、ニューレキソフィリン（neurexophilin）、それらの  
サブタイプまたはそれらの類縁体などが好ましく用いられる。

## （2）本発明の蛋白質欠乏症の予防・治療剤

上記（1）の方法において、本発明の蛋白質に対するリガンドが明らかになれば、該リガ  
ンドが有する作用に応じて、本発明の蛋白質または本発明の蛋白質をコードするDNAを本  
20 発明の蛋白質欠乏症の予防・治療剤などの医薬として使用することができる。

例えば、生体内において本発明の蛋白質が減少しているためにリガンドの生理作用が期待  
できない患者がいる場合に、①本発明の蛋白質を患者に投与し該蛋白質の量を補充したり、  
②（イ）本発明の蛋白質をコードするDNAを該患者に投与し発現させることによって、あ  
るいは（ロ）対象となる細胞に本発明の蛋白質をコードするDNAを挿入し発現させた後に  
25 、該細胞を該患者に移植することなどによって、患者の体内における蛋白質の量を増加させ  
、リガンドの作用を十分に発揮させることができる。したがって、本発明の蛋白質をコード

するDNAは、安全で低毒性な本発明の蛋白質欠乏症の予防・治療剤などの医薬として有用である。

本発明の蛋白質をコードするDNA（以下、本発明のDNAと略記する場合がある）を上記予防・治療剤として使用する場合は、本発明のDNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って実施することができる。本発明のDNAは、そのままで、あるいは摂取促進のための補助剤とともに、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。

例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、本発明のDNAを生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピ

レングリコール、ポリエチレングリコール)、非イオン性界面活性剤(例、ポリソルベート 80 (TM)、HCO-50)などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

5       また、上記予防・治療剤は、例えば、緩衝剤(例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液)、無痛化剤(例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど)、安定剤(例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど)、保存剤(例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど)、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

10       このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物(例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど)に対して投与することができる。

本発明の蛋白質またはDNAの投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人(60kgとして)においては、一日につき約0.1mg~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常成人(60kgとして)においては、一日につき約0.01~30mg程度、好ましくは約0.1~20mg程度、より好ましくは約0.1~10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与することができる。

### (3) 遺伝子診断剤

本発明のDNAは、プローブとして使用することにより、ヒトまたは哺乳動物(例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど)における本発明の蛋白質またはその部分ペプチドをコードするDNAまたはmRNAの異常(遺伝子異常)を検出することができるので、例えば、該DNAまたはmRNAの損傷、突然変異あるいは発現低下や、該DNAまたはmRNAの増加あるいは発現過多などの遺伝子診断剤として有用である。

本発明のDNAを用いる上記の遺伝子診断は、例えば、自体公知のノーザンハイブリダイゼーションやPCR-SSCP法（ゲノミクス（Genomics），第5巻，874～879頁（1989年）、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ユーエスエー（Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America），第86巻，2766～2770頁（1989年））などにより実施することができる。

（4）本発明の蛋白質に対するリガンドの定量法

本発明の蛋白質等は、リガンドに対して結合性を有しているので、生体内におけるリガンド濃度を感度良く定量することができる。

- 10 本発明の定量法は、例えば、競合法と組み合わせることによって用いることができる。すなわち、被検体を本発明の蛋白質等と接触させることによって被検体中のリガンド濃度を測定することができる。具体的には、例えば、以下の①または②などに記載の方法あるいはそれに準じる方法に従って用いることができる。

①入江寛編「ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和49年発行）

- 15 ②入江寛編「続ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和54年発行）

（5）本発明の蛋白質とリガンドとの結合性を変化させる化合物のスクリーニング方法

- 本発明の蛋白質等を用いるか、または組換え型蛋白質等の発現系を構築し、該発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、リガンドと本発明の蛋白質等との結合性を変化させる化合物（例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、  
20 発酵生産物など）またはその塩を効率よくスクリーニングすることができる。

- このような化合物には、（イ）G蛋白質共役型レセプターを介して細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $Ca^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を有する化合物（いわゆる、本発明の蛋白質に対するアゴニスト）、（ロ）該細胞刺激活性を有しない化合物（いわゆる、本発明の蛋白質に対するアンタゴニスト）、（ハ）リガンドと本発明の  
25

蛋白質との結合力を増強する化合物、あるいは(二)リガンドと本発明の蛋白質との結合力を減少させる化合物などが含まれる(なお、上記(イ)の化合物は、前記したリガンド決定方法によってスクリーニングすることが好ましい)。

すなわち、本発明は、(i)本発明の蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩と、リ  
5    ガンドとを接触させた場合と(ii)本発明の蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩と、  
リガンドおよび試験化合物とを接触させた場合との比較を行なうことを特徴とするリガ  
ンドと本発明の蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩との結合性を変化させる化合物ま  
たはその塩のスクリーニング方法を提供する。

本発明のスクリーニング方法においては、(i)と(ii)の場合における、例えば、該蛋  
10    白質等に対するリガンドの結合量、細胞刺激活性などを測定して、比較することを特徴とす  
る。

より具体的には、本発明は、

①標識したリガンドを、本発明の蛋白質等に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試  
験化合物を本発明の蛋白質等に接触させた場合における、標識したリガンドの該蛋白質等に  
15    対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明の蛋白質等との結合性  
を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

②標識したリガンドを、本発明の蛋白質等を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させ  
た場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を本発明の蛋白質等を含有する細胞または該  
細胞の膜画分に接触させた場合における、標識したリガンドの該細胞または該膜画分に対す  
20    る結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明の蛋白質等との結合性を変  
化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

③標識したリガンドを、本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞  
膜上に発現した蛋白質等に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を本発明  
のDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明の蛋白質  
25    等と接触させた場合における、標識したリガンドの該蛋白質等に対する結合量を測定し、比  
較することを特徴とするリガンドと本発明の蛋白質等との結合性を変化させる化合物または

その塩のスクリーニング方法、

- ④本発明の蛋白質等を活性化する化合物（例えば、本発明の蛋白質等に対するリガンドなど）を本発明の蛋白質等を含有する細胞に接触させた場合と、本発明の蛋白質等を活性化する化合物および試験化合物を本発明の蛋白質等を含有する細胞に接触させた場合における、レセプターを介した細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  遊離、細胞内 c AMP 生成、細胞内 c GMP 生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c - f o s の活性化、pH の低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明の蛋白質等との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、および
- ⑤本発明の蛋白質等を活性化する化合物（例えば、本発明の蛋白質等に対するリガンドなど）を本発明の DNA を含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明の蛋白質等に接触させた場合と、本発明の蛋白質等を活性化する化合物および試験化合物を本発明の DNA を含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明の蛋白質等に接触させた場合における、レセプターを介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  遊離、細胞内 c AMP 生成、細胞内 c GMP 生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c - f o s の活性化、pH の低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明の蛋白質等との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。
- 本発明の蛋白質等が得られる以前は、G 蛋白質共役型レセプターアゴニストまたはアンタゴニストをスクリーニングする場合、まずラットなどの G 蛋白質共役型レセプター蛋白質を含む細胞、組織またはその細胞膜画分を用いて候補化合物を得て（一次スクリーニング）、その後該候補化合物が実際にヒトの G 蛋白質共役型レセプター蛋白質とリガンドとの結合を阻害するか否かを確認する試験（二次スクリーニング）が必要であった。細胞、組織または細胞膜画分をそのまま用いれば他のレセプター蛋白質も混在するために、目的とするレセプター蛋白質に対するアゴニストまたはアンタゴニストを実際にスクリーニングすることは

困難であった。

しかしながら、例えば、本発明のヒト由来蛋白質を用いることによって、一次スクリーニングの必要がなくなり、リガンドとG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物を効率良くスクリーニングすることができる。さらに、スクリーニングされた化合物が  
5 アゴニストかアンタゴニストかを簡便に評価することができる。

本発明のスクリーニング方法の具体的な説明を以下にする。

まず、本発明のスクリーニング方法に用いる本発明の蛋白質等としては、前記した本発明の蛋白質等を含有するものであれば何れのものであってもよいが、本発明の蛋白質等を含有する哺乳動物の臓器の細胞膜画分が好適である。しかし、特にヒト由来の臓器は入手が極めて困難なことから、スクリーニングに用いられるものとしては、組換え体を用いて大量発現  
10 させたヒト由来のレセプター蛋白質等などが適している。

本発明の蛋白質等を製造するには、前述の方法が用いられるが、本発明のDNAを哺乳細胞や昆虫細胞で発現することにより行なうことが好ましい。目的とする蛋白質部分をコードするDNA断片には相補DNAが用いられるが、必ずしもこれに制約されるものではない。  
15 例えば、遺伝子断片や合成DNAを用いてもよい。本発明の蛋白質をコードするDNA断片を宿主動物細胞に導入し、それらを効率よく発現させるためには、該DNA断片を昆虫を宿主とするバキュロウイルスに属する核多角体病ウイルス (nuclear polyhedrosis virus ; NPV) のポリヘドリンプロモーター、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒトヒートショックプロモーター、サイトメガ  
20 ロウイルスプロモーター、SR $\alpha$ プロモーターなどの下流に組み込むのが好ましい。発現したレセプターの量と質の検査はそれ自体公知の方法で行うことができる。例えば、文献 [Nambi, P. ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.) , 267 巻, 19555~19559 頁, 1992 年] に記載の方法に従って行なうことができる。

したがって、本発明のスクリーニング方法において、本発明の蛋白質等を含有するものとして、それ自体公知の方法に従って精製した蛋白質等であってもよいし、該蛋白質等を含有する細胞を用いてもよく、また該蛋白質等を含有する細胞の膜画分を用いてもよい。

25



本発明のスクリーニング方法において、本発明の蛋白質等を含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法はそれ自体公知の方法に従って行なうことができる。

本発明の蛋白質等を含有する細胞としては、該蛋白質等を発現した宿主細胞をいうが、該  
5 宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが好ましい。

細胞膜画分としては、細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem 型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン (Kinematica 社製) のよる破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させること  
10 による破碎などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速 (500 rpm ~ 3000 rpm) で短時間 (通常、約1分~10分) 遠心し、上清をさらに高速 (15000 rpm ~ 30000 rpm) で通常30分~2時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現した蛋白質等と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が  
15 多く含まれる。

該蛋白質等を含有する細胞や膜画分中の該蛋白質の量は、1細胞当たり  $10^3 \sim 10^8$  分子であるのが好ましく、 $10^5 \sim 10^7$  分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性 (比活性) が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

20 リガンドと本発明の蛋白質等との結合性を变化させる化合物をスクリーニングする前記の①~③を実施するためには、例えば、適当な蛋白質画分と、標識したリガンドが必要である。

蛋白質画分としては、天然型のレセプター蛋白質画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型レセプター蛋白質画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガ  
25 ド結合活性、シグナル情報伝達作用などを示す。

標識したリガンドとしては、標識したリガンド、標識したリガンドアナログ化合物などが

用いられる。例えば  $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$  などで標識されたり  
リガンドなどが用いられる。

具体的には、リガンドと本発明の蛋白質等との結合性を变化させる化合物のスクリーニ  
ングを行なうには、まず本発明の蛋白質等を含有する細胞または細胞の膜画分を、スクリー  
5     ングに適したバッファーに懸濁することにより蛋白質標品を調製する。バッファーには、p  
H 4~10（望ましくはpH 6~8）のリン酸バッファー、トリス-塩酸バッファーなどの  
リガンドと蛋白質との結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異  
的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80<sup>TM</sup>（花王-アトラス社）、ジ  
ギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤をバッファーに加えることもできる。さらに  
10     、プロテアーゼによるレセプターやリガンドの分解を抑える目的でPMSF、ロイペプチン  
、E-64（ペプチド研究所製）、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加すること  
もできる。0.01ml~10mlの該レセプター溶液に、一定量（5000cpm~500  
000cpm）の標識したリガンドを添加し、同時に $10^{-4}\text{M}$ ~ $10^{-10}\text{M}$ の試験化合  
物を共存させる。非特異的結合量（NSB）を知るために大過剰の未標識のリガンドを加え  
15     た反応チューブも用意する。反応は約0℃から50℃、望ましくは約4℃から37℃で、約  
20分から24時間、望ましくは約30分から3時間行う。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾  
過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチ  
レーションカウンターまたはγ-カウンターで計測する。拮抗する物質がない場合のカウン  
ト（B0）から非特異的結合量（NSB）を引いたカウント（B0-NSB）を100%とし  
20     た時、特異的結合量（B-NSB）が、例えば、50%以下になる試験化合物を拮抗阻害能  
力のある候補物質として選択することができる。

リガンドと本発明の蛋白質等との結合性を变化させる化合物スクリーニングする前記の④  
~⑤の方法を実施するためには、例えば、蛋白質を介する細胞刺激活性（例えば、アラキド  
ン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生  
25     成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活  
性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を公知の方法または市販の

測定用キットを用いて測定することができる。

具体的には、まず、本発明の蛋白質等を含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。スクリーニングを行なうにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、

- 5 細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質（例えば、アラキドン酸など）の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、cAMP産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。

- 10 細胞刺激活性を測定してスクリーニングを行なうには、適当な蛋白質を発現した細胞が必要である。本発明の蛋白質等を発現した細胞としては、天然型の本発明の蛋白質等を有する細胞株、前述の組換え型蛋白質等を発現した細胞株などが望ましい。

試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが用いられ、これら化合物は新

- 15 規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

リガンドと本発明の蛋白質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キットは、本発明の蛋白質等、本発明の蛋白質等を含有する細胞、または本発明の蛋白質等を含有する細胞の膜画分を含有するものなどである。

本発明のスクリーニング用キットの例としては、次のものが挙げられる。

- 20 1. スクリーニング用試薬

①測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution（ギブコ社製）に、0.05%のウシ血清アルブミン（シグマ社製）を加えたもの。

- 25 孔径0.45  $\mu$ mのフィルターで濾過滅菌し、4℃で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

②G蛋白質共役型レセプター標品

本発明の蛋白質を発現させたCHO細胞を、12穴プレートに $5 \times 10^5$ 個/穴で継代し、37℃、5%CO<sub>2</sub>、95%airで2日間培養したもの。

### ③標識リガンド

市販の [<sup>3</sup>H]、[<sup>125</sup>I]、[<sup>14</sup>C]、[<sup>35</sup>S]などで標識したリガンド 水溶液の状態のものを4℃あるいは-20℃にて保存し、用時に測定用緩衝液にて1μMに希釈する。

### ④リガンド標準液

リガンドを0.1%ウシ血清アルブミン(シグマ社製)を含むPBSで1mMとなるように溶解し、-20℃で保存する。

## 10 2. 測定法

①12穴組織培養用プレートにて培養した本発明の蛋白質発現CHO細胞を、測定用緩衝液1mlで2回洗浄した後、490μlの測定用緩衝液を各穴に加える。

② $10^{-3} \sim 10^{-10}$ Mの試験化合物溶液を5μl加えた後、標識リガンドを5μl加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るためには試験化合物の代わりに $10^{-3}$ Mのリガンドを5μl加えておく。

③反応液を除去し、1mlの洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識リガンドを0.2N NaOH-1%SDSで溶解し、4mlの液体シンチレーターA(和光純薬製)と混合する。

④液体シンチレーションカウンター(ベックマン社製)を用いて放射活性を測定し、Percent Maximum Binding (PMB) を次の式〔数1〕で求める。

〔数1〕

$$PMB = [(B - NSB) / (B_0 - NSB)] \times 100$$

PMB : Percent Maximum Binding

B : 検体を加えた時の値

25 NSB : Non-specific Binding (非特異的結合量)

B<sub>0</sub> : 最大結合量

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、リガンドと本発明の蛋白質等との結合性を变化させる作用を有する化合物であり、具体的には、（イ）G蛋白質共役型レセプターを介して細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $Ca^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を有する化合物（いわゆる、本発明の蛋白質に対するアゴニスト）、（ロ）該細胞刺激活性を有しない化合物（いわゆる、本発明の蛋白質に対するアンタゴニスト）、（ハ）リガンドと本発明のG蛋白質共役型蛋白質との結合力を増強する化合物、あるいは（ニ）リガンドと本発明のG蛋白質共役型蛋白質との結合力を減少させる化合物である。

該化合物としては、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

本発明の蛋白質等に対するアゴニストは、本発明の蛋白質等に対するリガンドが有する生理活性と同様の作用を有しているので、該リガンド活性に応じて安全で低毒性な医薬として有用である。

本発明の蛋白質等に対するアンタゴニストは、本発明の蛋白質等に対するリガンドが有する生理活性を抑制することができるので、該リガンド活性を抑制する安全で低毒性な医薬として有用である。

リガンドと本発明の蛋白質との結合力を増強する化合物は、本発明の蛋白質等に対するリガンドが有する生理活性を増強するための安全で低毒性な医薬として有用である。

リガンドと本発明の蛋白質との結合力を減少させる化合物は、本発明の蛋白質等に対するリガンドが有する生理活性を減少させるための安全で低毒性な医薬として有用である。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩を上記の医薬組成物として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、前記した本発明のDNAを含有する医薬と同様にして、錠剤、カプセル剤、エリ

キシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性溶液、懸濁液剤などとすることができる。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

- 5     該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人（60 kgとして）においては、一日につき約0.1～100 mg、好ましくは約1.0～50 mg、より好ましくは約1.0～20 mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常成人（60 kgとして）においては、
- 10    一日につき約0.01～30 mg程度、好ましくは約0.1～20 mg程度、より好ましくは約0.1～10 mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg当りに換算した量を投与することができる。

（6）本発明の蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩の定量

- 本発明の抗体は、本発明の蛋白質等を特異的に認識することができるので、被検液中の本
- 15    発明の蛋白質等の定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。すなわち、本発明は、例えば、（i）本発明の抗体と、被検液および標識化蛋白質等とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化蛋白質等の割合を測定することを特徴とする被検液中の本発明の蛋白質等の定量法、

- （ii）被検液と担体上に不溶化した本発明の抗体および標識化された本発明の抗体とを同時
- 20    あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の本発明の蛋白質等の定量法を提供する。

上記（ii）においては、一方の抗体が本発明の蛋白質等のN端部を認識する抗体で、他方の抗体が本発明の蛋白質等のC端部に反応する抗体であることが好ましい。

- 本発明の蛋白質等に対するモノクローナル抗体（以下、本発明のモノクローナル抗体と称
- 25    する場合がある）を用いて本発明の蛋白質等の測定を行なえるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体

分子の $F(ab')_2$ 、 $Fab'$ 、あるいは $Fab$ 画分を用いてもよい。本発明の蛋白質等に対する抗体を用いる測定法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えば、蛋白質量）に対応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。

標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、 $[^{125}I]$ 、 $[^{131}I]$ 、 $[^3H]$ 、 $[^{14}C]$ などが用いられる。上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが用いられる。発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン-アビジン系を用いることもできる。

抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常、蛋白質あるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、例えば、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等が用いられる。

サンドイッチ法においては不溶化した本発明のモノクローナル抗体に被検液を反応させ（1次反応）、さらに標識化した本発明のモノクローナル抗体を反応させ（2次反応）たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の本発明の蛋白質量を定量することができる。1次反応と2次反応は逆の順序に行なっても、また、同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができる。

また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも1種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で2種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

本発明のサンドイッチ法による本発明の蛋白質等の測定法においては、1次反応と2次反  
5 応に用いられる本発明のモノクローナル抗体は本発明の蛋白質等の結合する部位が異なる抗体が好ましく用いられる。即ち、1次反応および2次反応に用いられる抗体は、例えば、2次反応で用いられる抗体が、本発明の蛋白質のC端部を認識する場合、1次反応で用いられる抗体は、好ましくはC端部以外、例えばN端部を認識する抗体が用いられる。

本発明のモノクローナル抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イ  
10 ムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる。競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原と(F)と抗体と結合した標識抗原(B)とを分離し(B/F分離)、B、Fいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、B/F分離をポリエチレングリコール、前記抗体に対する第2抗体などを用いる液相法、および、第  
15 1抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第1抗体は可溶性のものを用い第2抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。

イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相  
20 と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。

また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果、生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

これら個々の免疫学的測定法を本発明の測定方法に適用するにあたっては、特別の条件、  
25 操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の方法、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて本発明の蛋白質またはその塩の測定系を構築すればよい。これらの



一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる〔例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(医学書院、昭和53年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第2版)(医学書院、昭和57年  
5 発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第3版)(医学書院、昭和62年発行)、「メソッズ・イン・エンジモロジー(Methods in ENZYMOLOGY)」Vol. 70(Immunochemical Techniques(Part A))、同書 Vol. 73(Immunochemical Techniques(Part B))、同書 Vol. 74(Immunochemical Techniques(Part C))、同書 Vol. 84(Immunochemical Techniques(Part D:Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92(Immunochemical Techniques(Part E:Monoclonal  
10 Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121(Immunochemical Techniques(Part I:Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies)) (以上、アカデミックプレス社発行)など参照〕。

以上のように、本発明の抗体を用いることによって、本発明の蛋白質またはその塩を感度  
良く定量することができる。さらに、本発明の抗体を用いて本発明の蛋白質またはその塩を  
15 定量することによって、各種疾病の診断をすることができる。

また、本発明の抗体は、体液や組織などの被検体中に存在する本発明の蛋白質等を検出  
するために使用することができる。また、本発明の蛋白質等を精製するために使用する抗体カ  
ラムの作製、精製時の各分画中の本発明の蛋白質等の検出、被検細胞内における本発明の蛋  
白質の挙動の分析などのために使用することができる。

## 20 (7) 本発明のG蛋白質共役型蛋白質をコードするDNAを有する非ヒト動物の作製

本発明のDNAを用いて、本発明の蛋白質等を発現するトランスジェニック非ヒト動物を  
作製することができる。非ヒト動物としては、哺乳動物(例えば、ラット、マウス、ウサギ  
、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど)など(以下、動物と略記する)が挙げれる  
が、特に、マウス、ウサギなどが好適である。

25 本発明のDNAを対象動物に転移させるにあたっては、該DNAを動物細胞で発現させう  
るプロモーターの下流に結合した遺伝子コンストラクトとして用いるのが一般に有利である

。例えば、ウサギ由来の本発明のDNAを転移させる場合、これと相同性が高い動物由来の本発明のDNAを動物細胞で発現させうる各種プロモーターの下流に結合した遺伝子コンストラクトを、例えば、ウサギ受精卵へマイクロインジェクションすることによって本発明の蛋白質等を高産生するDNA転移動物を作出できる。このプロモーターとしては、例えば、

5 ウイルス由来プロモーター、メタロチオネイン等のユビキアスな発現プロモーターも使用しうるが、好ましくは脳で特異的に発現するNGF遺伝子プロモーターやエノラーゼ遺伝子プロモーターなどが用いられる。

受精卵細胞段階における本発明のDNAの転移は、対象動物の胚芽細胞および体細胞の全てに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の蛋白質等が存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞及び体細胞の全てに本発明の蛋白質等を有することを意味する。遺伝子を受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の蛋白質等を有する。

10

本発明のDNA転移動物は、交配により遺伝子を安定に保持することを確認して、該DNA保有動物として通常の飼育環境で飼育継代を行うことができる。さらに、目的DNAを保有する雌雄の動物を交配することにより、導入遺伝子を相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを有するように繁殖継代することができる。

15

本発明のDNAが転移された動物は、本発明の蛋白質等が高発現させられているので、本発明の蛋白質等に対するアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング用の動物などとして有用である。

20

本発明のDNA転移動物を、組織培養のための細胞源として使用することもできる。例えば、本発明のDNA転移マウスの組織中のDNAもしくはRNAを直接分析するか、あるいは遺伝子により発現された本発明の蛋白質が存在する組織を分析することにより、本発明の蛋白質等について分析することができる。本発明の蛋白質等を有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用して、例えば、脳や末梢組織由来のような一般に培養困難な組織からの細胞の機能を研究することができる。また、その細胞を用いることにより

25

、例えば、各種組織の機能を高めるような医薬の選択も可能である。また、高発現細胞株があれば、そこから、本発明の蛋白質等を単離精製することも可能である。

本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣  
5 用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

	DNA	: デオキシリボ核酸
	cDNA	: 相補的デオキシリボ核酸
	A	: アデニン
10	T	: チミン
	G	: グアニン
	C	: シトシン
	RNA	: リボ核酸
	mRNA	: メッセンジャーリボ核酸
15	dATP	: デオキシアデノシン三リン酸
	dTTP	: デオキシチミジン三リン酸
	dGTP	: デオキシグアノシン三リン酸
	dCTP	: デオキシシチジン三リン酸
	ATP	: アデノシン三リン酸
20	EDTA	: エチレンジアミン四酢酸
	SDS	: ドデシル硫酸ナトリウム
	Gly	: グリシン
	Ala	: アラニン
	Val	: バリン
25	Leu	: ロイシン
	Ile	: イソロイシン

	S e r	: セリン
	T h r	: スレオニン
	C y s	: システイン
	M e t	: メチオニン
5	G l u	: グルタミン酸
	A s p	: アスパラギン酸
	L y s	: リジン
	A r g	: アルギニン
	H i s	: ヒスチジン
10	P h e	: フェニルアラニン
	T y r	: チロシン
	T r p	: トリプトファン
	P r o	: プロリン
	A s n	: アスパラギン
15	G l n	: グルタミン
	p G l u	: ピログルタミン酸
	M e	: メチル基
	E t	: エチル基
	B u	: ブチル基
20	P h	: フェニル基
	T C	: チアゾリジン-4 (R) -カルボキサミド基

また、本明細書中で繁用される置換基、保護基および試薬を下記の記号で表記する。

	T o s	: p-トルエンスルフォニル
25	C H O	: ホルミル
	B z l	: ベンジル

- Cl<sub>2</sub>Bzl : 2, 6-ジクロロベンジル
- Bom : ベンジルオキシメチル
- Z : ベンジルオキシカルボニル
- Cl-Z : 2-クロロベンジルオキシカルボニル
- 5 Br-Z : 2-ブロモベンジルオキシカルボニル
- Boc : t-ブトキシカルボニル
- DNP : ジニトロフェノール
- Trt : トリチル
- Bom : t-ブトキシメチル
- 10 Fmoc : N-9-フルオレニルメトキシカルボニル
- HOBt : 1-ヒドロキシベンズトリアゾール
- HOObt : 3, 4-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-4-オキソ-  
1, 2, 3-ベンゾトリアジン
- HONB : 1-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2, 3-ジカルボキシイミド
- 15 DCC : N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド

本明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

[配列番号：1]

本発明のヒト脳由来蛋白質のアミノ酸配列を示す。

[配列番号：2]

- 20 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有する本発明のヒト脳由来蛋白質をコードする  
DNAの塩基配列を示す。

[配列番号：3]

本発明のヒト脳由来蛋白質のアミノ酸配列を示す。

[配列番号：4]

- 25 配列番号：3で表わされるアミノ酸配列を有する本発明のヒト脳由来蛋白質をコードする  
DNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：5〕

本発明のヒト脳由来蛋白質のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：6〕

配列番号：5で表わされるアミノ酸配列を有する本発明のヒト脳由来蛋白質をコードする

5 DNAの塩基配列を示す。

後述の実施例1で得られた形質転換体エシェリヒア コリ (Escherichia coli) JM109 / pHK05006は、平成10年7月21日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (NIBH) に寄託番号FERM BP-6433として、平成10年7月8日から財団法人・発酵研究所 (IFO) に寄託番号IFO 16189として寄託されている。

10 後述の実施例2で得られた形質転換体エシェリヒア コリ (Escherichia coli) JM109 / pHK05490は、平成10年8月7日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (NIBH) に寄託番号FERM BP-6456として寄託されている。

後述の実施例3で得られた形質転換体エシェリヒア コリ (Escherichia coli) JM109 / pHH02631は、平成10年10月6日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術  
15 研究所 (NIBH) に寄託番号FERM BP-6540として寄託されている。

#### 実施例

以下に実施例を示して、本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。なお、大腸菌を用いての遺伝子操作法は、モレキュラー・クローニング (Molecular cloning) に記載されている方法に従った。  
20

#### 実施例1

ヒト脳由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の探索と塩基配列の決定 (1)

DNAリサーチ (DNA RESEARCH) 第4巻、第53-59頁 (1997年) に  
25 記載の方法またはそれに準じた方法に基づいて得られたcDNAにコードされるアミノ酸配列に対して、既知の受容体の配列；特にヒトORF受容体配列を鋳型にしてホモロジーサー

チをしたところ、配列番号：1（図1および図2中のアミノ酸配列）で表されるアミノ酸配列が相同性を示した。

次に配列番号：1（図1および図2中のアミノ酸配列）でアミノ酸配列に相当するcDNAを配列解析したところ、配列番号：2（図1および図2中の塩基配列）のようになった。

- 5 その疎水性プロットは図3のようになり、7回膜貫通型（G蛋白共役型）のレセプターをコードしていることが判明した。

さらに、配列番号：2で表されるDNAを保持するプラスミドpHK05006をE. coli JM109に導入してE. coli JM109/pHK05006を得た。

## 10 実施例2

ヒト脳由来のG蛋白共役型レセプター蛋白質の探索と塩基配列の決定（2）

- DNAリサーチ（DNA RESEARCH）第4巻、第53-59頁（1997年）に記載の方法またはそれに準じた方法に基づいて得られたcDNA〔配列番号：4（図7～図15中のDNA配列）〕にコードされるアミノ酸配列に対して、既知の受容体の配列；特に
- 15 ヒトORF受容体配列を鋳型にしてホモロジーサーチをしたところ、配列番号：3（図4および図5中HK05490で表されるアミノ酸配列；図7～図15中のアミノ酸配列）で表されるアミノ酸配列が相同性を示した。

- 次に疎水性プロットを解析したところ、図6のようになり、7回膜貫通型（G蛋白共役型）のレセプターをコードしていることが判明した。また、配列番号：3で表されるアミノ酸
- 20 配列で表される蛋白質は実施例1に記載の配列番号：1で表されるアミノ酸配列で表される蛋白質と高い相同性を示すことが確認された（図4）。

さらに、本発明の配列番号：4で表されるDNAを保持するプラスミドpHK05490をE. coli JM109に導入してE. coli JM109/pHK05490を得た。

## 25 実施例3

ヒト脳由来のG蛋白共役型レセプター蛋白質の探索と塩基配列の決定（1）

DNAリサーチ (DNA RESEARCH) 第4巻、第53-59頁 (1997年) に記載の方法またはそれに準じた方法に基づいて得られたcDNAにコードされるアミノ酸配列に対して、既知の受容体の配列; 特にヒトORF受容体配列を鋳型にしてホモロジーサーチをしたところ、配列番号: 5で表されるアミノ酸配列が相同性を示した。

- 5 次に配列番号: 5でアミノ酸配列に相当するcDNAを配列解析したところ、配列番号: 6のようになった。その疎水性プロットは図25のようになり、7回膜貫通型 (G蛋白共役型) のレセプターをコードしていることが判明した。

さらに、配列番号: 6で表されるDNAを保持するプラスミドpHH02631をE. coli JM109に導入してE. coli JM109/pHH02631を得た。

10

#### 産業上の利用可能性

- 本発明の蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩、およびそれらをコードするDNAは、①リガンド (アゴニスト) の決定、②抗体および抗血清の入手、③組み替え型蛋白質の発現系の構築、④同発現系を用いたレセプター結合アッセイ系の開発と医薬品候補化合物のスクリーニング、⑤構造的に類似したリガンド・レセプターとの比較にもとづいたドラッグデザインの実施、⑥遺伝子診断におけるプローブやPCRプライマーの作成のための試薬、⑦トランスジェニック動物の作製または⑧遺伝子予防・治療剤等の医薬等として用いることができる。
- 15



## 請求の範囲

1. 配列番号：1、配列番号：3または配列番号：5で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とする蛋白質またはその塩。
2. 請求項1記載の蛋白質の部分ペプチドまたはその塩。
- 5 3. 請求項1記載の蛋白質をコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNA。
4. 配列番号：2、配列番号：4または配列番号：6で表される塩基配列を有する請求項3記載のDNA。
5. 請求項3記載のDNAを含有する組換えベクター。
6. 請求項5記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体。
- 10 7. 請求項6記載の形質転換体を培養し、請求項1記載の蛋白質を生成・蓄積せしめることを特徴とする請求項1記載の蛋白質またはその塩の製造法。
8. 請求項1記載の蛋白質、請求項2記載の部分ペプチドまたはそれらの塩に対する抗体。
9. 請求項1記載の蛋白質、請求項2記載の部分ペプチドまたはそれらの塩を用いることを特徴とする請求項1記載の蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法。
- 15 10. 請求項1記載の蛋白質、請求項2記載の部分ペプチドまたはそれらの塩を用いることを特徴とするリガンドと請求項1記載の蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。
11. 請求項1記載の蛋白質、請求項2記載の部分ペプチドまたはそれらの塩を含有することを特徴とするリガンドと請求項1記載の蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット。
- 20 12. 請求項10記載のスクリーニング方法または請求項11記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、リガンドと請求項1記載の蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩。
13. 請求項10記載のスクリーニング方法または請求項11記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、リガンドと請求項1記載の蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬。
- 25

14. 請求項3記載のDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA。
15. 請求項1記載の蛋白質をコードする塩基配列を含有するヌクレオチド。
16. 請求項1記載の蛋白質をコードする塩基配列と相補的な塩基配列の一部を含有してなるヌクレオチド。
- 5



1

1 GCTGAACAGACAAGAAATCACTTGAATGCTGGGACATCAGCTACTGTGTCGGGCCATG 60  
 1 AlaGluGlnThrArgAsnHisLeuAsnAlaGlyAspIleThrTyrSerValArgAlaMet 20  
 61 GACCAGCTGGTAGGCCTCTAGATGTACAGCTTCGGAACCTGACCCAGGTGGAAAAGAT 120  
 21 AspGlnLeuValGlyLeuLeuAspValGlnLeuArgAsnLeuThrProGlyGlyLysAsp 40  
 121 AGTGTGCCCCGGAGTTTGAACAAGGCAATGGTCGAGACAGTTAACAACCTCTTCAGCCA 160  
 41 SerAlaAlaArgSerLeuAsnLysAlaMetValGluThrValAsnAsnLeuLeuGlnPro 60  
 181 CAAGCTTTGAATGCATGGAGAGACCTGACTACGAGTGATCAGCTGCCGTGCGGCCACCATG 240  
 61 ClnAlaLeuAsnAlaTrpArgAspLeuThrThrSerAspGlnLeuArgAlaAlaThrMet 80  
 241 TTGCTTCATACTGTGGAGGAAAGTGCTTTTGTGCTGGCTGATAACCTTTTGAAGACTGAC 300  
 91 LeuLeuHisThrValGluGluSerAlaPheValLeuAlaAspAsnLeuLeuLysThrAsp 100  
 301 ATTGTGACGGGAGAAATACAGACAATTTAAATTGAAGTTGCAAGACTGAGCACAGAAGGA 360  
 101 IleValArgGluAsnThrAspAsnIleLysLeuGluValAlaArgLeuSerThrGluGly 120  
 361 AACTTAGAAGACCTAAAAATTTCCAGAAAACATGGGCCATGGAAGCACTATCCAGCTGTCT 420  
 121 AsnLeuGluAspLeuLysPheProGluAsnMetGlyHisGlySerThrIleGlnLeuSer 140  
 421 GCAAAATACCTTAAAGCAAAATGGCCGAAATGGAGAGATCAGAGTGGCCTTTGTCTGTAT 480  
 141 AlaAsnThrLeuLysGlnAsnGlyArgAsnGlyGluIleArgValAlaPheValLeuTyr 160  
 481 AACAACTTGGGTCTTATTTATCCACGGAGAATGCCAGTATGAAGTTGGGAACGGAAGCT 540  
 161 AsnAsnLeuGlyProTyrLeuSerThrGluAsnAlaSerMetLysLeuGlyThrGluAla 180  
 541 TTGTCCACAAATCATCTGTATTGTCAATTCCTCTTTATTACGGCAGCAATAACAAA 600  
 181 LeuSerThrAsnHisSerValIleValAsnSerProValIleThrAlaAlaIleAsnLys 200  
 601 GAGTTTCAGTAACAAGGTTTATTTGGCTGATCCTGTGGTATTTACTGTTAAACATATCAAG 660  
 201 GluPheSerAsnLysValTyrLeuAlaAspProValValPheThrValLysHisIleLys 220  
 661 CAGTCAGAGGAAAATTTCAACCTTAACCTGTTTCAATTTTGGAGCTACTCCAAGCGTACAATG 720  
 221 GlnSerGluGluAsnPheAsnProAsnCysSerPheTrpSerTyrSerLysArgThrMet 240  
 721 ACAGGTTATTGGTCAACACAAGGCTGTGGCTCCTGACAACAAATAAGACACATACTACA 780  
 241 ThrGlyTyrTrpSerThrGlnGlyCysArgLeuLeuThrThrAsnLysThrHisThrThr 260  
 781 TGCTCTTGTAACCACTTAACAAATTTGCACTACTGATGGCACATGTGGAAGTTAAGCAC 840  
 261 CysSerCysAsnHisLeuThrAsnPheAlaValLeuMetAlaHisValGluValLysHis 280  
 841 AGTGATGGCGTCCATGACCTCCTCTGGATGTGATCAGTGGGTGGAATTTTGTCTGCC 900  
 281 SerAspAlaValHisAspLeuLeuLeuAspValIleThrTrpValGlyIleLeuLeuSer 300  
 901 CTGTGTTGTCTCTGATTGTCATCTTCACATTTTGTCTTTTCCGGGGCTCCAGAGTGAC 960  
 301 LeuValCysLeuLeuIleCysIlePheThrPheCysPhePheArgGlyLeuGlnSerAsp 320  
 961 CGTAACACCATCCCAAGAACTCTGCATCAGTCTCTTTGTAGCAGAGCTGCTCTTCCTG 1020  
 321 ArgAsnThrIleHisLysAsnLeuCysIleSerLeuPheValAlaGluLeuLeuPheLeu 340  
 1021 ATTGGGATCAACCGAACTGACCAACCAATTGCCTGTGCTGTTTTCGCTGCCCTGTTACAT 1080  
 341 IleGlyIleAsnArgThrAspGlnProIleAlaCysAlaValPheAlaAlaLeuLeuHis 360  
 1081 TTCCTTCTCTGGCTGCCCTACCTGGATGTTCTGGAGGGGGTGCAGCTTTATATCATG 1140  
 361 PhePhePheLeuAlaAlaPheThrTrpMetPheLeuGluGlyValGlnLeuTyrIleMet 380  
 1141 CTGGTGGAGGTTTGTGAGAGTGAACATTCACGTAGGAAATACCTTTATCTGGTCGGCTAT 1200  
 381 LeuValGluValPheGluSerGluHisSerArgArgLysTyrPheTyrLeuValGlyTyr 400  
 1201 GGGATGCCTGCACTCATTTGGCTGTGTGTCAGCTGCAGTAGACTACAGGAGTTATGGAACA 1260  
 401 GlyMetProAlaLeuIleValAlaValSerAlaAlaValAspTyrArgSerTyrGlyThr 420  
 1261 GATAAAGTATGTTGGCTCCGACTTGACACCTACTTCATTTGGAGTTTATAGGACCAGCA 1320  
 421 AspLysValCysTrpLeuArgLeuAspThrTyrPheIleTrpSerPheIleGlyProAla 440  
 1321 ACTTTGATAATTATGCTTAATGTAATCTTCCTTGGGATTGCTTTATATAAAATGTTTCAT 1380  
 441 ThrLeuIleIleMetLeuAsnValIlePheLeuGlyIleAlaLeuTyrLysMetPheHis 460  
 1381 CATACTGTCTACTGAAACCTGAATCAGGCTGTCTTGATAACATCAAGTCATGGGTTATA 1440  
 461 HisThrAlaIleLeuLysProGluSerGlyCysLeuAspAsnIleLysSerIrpValIle 480  
 1441 GGTGCAATAGCTCTTCTCTGCCATATTAGGATTGACCTGGGCTTTGGACTCATGTATATT 1500  
 481 GlyAlaIleAlaLeuLeuCysLeuLeuGlyLeuThrTrpAlaPheGlyLeuMetTyrIle 500

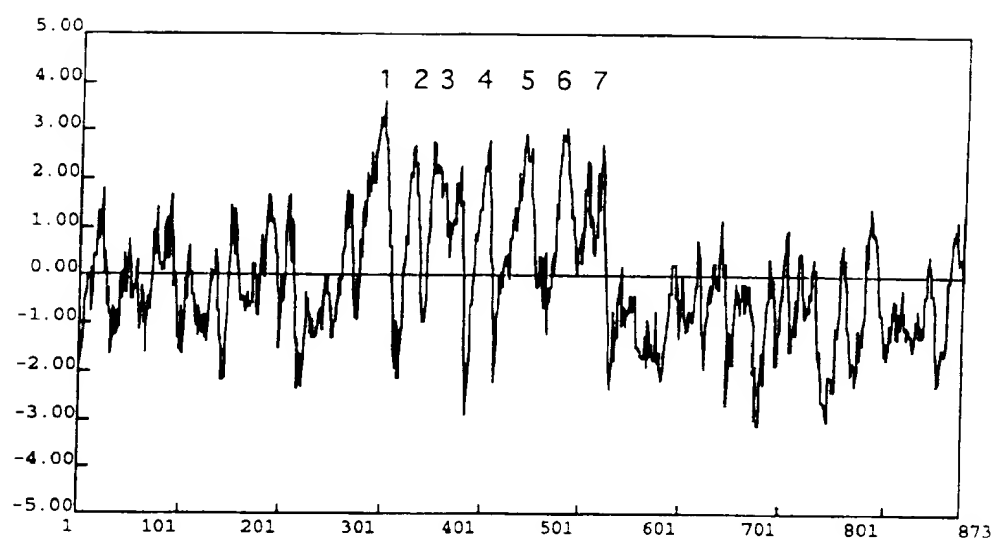


2

1501	AATGAAAGCACAGTCATCATGGCCTATCTCTCACCATTTCATTCCTACAGGGAATG	1560
501	AsnGluSerThrValIleMetAlaTyrLeuPheThrIlePheAsnSerLeuGlnGlyMet	520
1561	TTTATATTTATTTTCCATTGTGTCTACAGAAGAAGGTACGAAAAGAGTATGGGAAATGC	1620
521	PheIlePheIlePheHisCysValLeuGlnLysLysValArgLysGluTyrGlyLysCys	540
1621	CTGCGAACACATTGCTGTAGTGGCAAAAGTACAGAGAGTTCCATTGGTTCAGGGAAAACA	1680
541	LeuArgThrHisCysCysSerGlyLysSerThrGluSerSerIleGlySerGlyLysThr	560
1681	TCTGGTTCTCGAACTCCTGGACGCTACTCCACAGGCTCACAGAGCCGAATCCGTAGAATG	1740
561	SerGlySerArgThrProGlyArgTyrSerThrGlySerGlnSerArgIleArgArgMet	580
1741	TGGAATGACACGGTTCGAAAGCAGTCAGAGTCTTCCTTTATTACTGGAGACATAAACAGT	1800
581	TrpAsnAspThrValArgLysGlnSerGluSerSerPheIleThrGlyAspIleAsnSer	600
1801	TCAGCGTCACTCAACAGAGAGGGGCTTCTGAACAATGCCAGGATACAAGTGTCATGGAT	1860
601	SerAlaSerLeuAsnArgGluGlyLeuLeuAsnAsnAlaArgAspThrSerValMetAsp	620
1861	ACTCTACCACTGAATGGTAACCATGGCAATAGTTACAGCATTGCCAGCGCGAATACCTG	1920
621	ThrLeuProLeuAsnGlyAsnHisGlyAsnSerTyrSerIleAlaSerGlyGluTyrLeu	640
1921	AGCAACTGTGTGCAATCATAGACCGTGGCTATAACCATACAGAGACCGCCCTAGAGAAA	1980
641	SerAsnCysValGlnIleIleAspArgGlyTyrAsnHisAsnGluThrAlaLeuGluLys	660
1981	AAGATTCTGAAGGAACCTCACTTCCAACCTATATCCCTTCTTACCTGAACAACCATGAGCGC	2040
661	LysIleLeuLysGluLeuThrSerAsnTyrIleProSerTyrLeuAsnAsnHisGluArg	680
2041	TCCAGTGAACAGAACAGGAATCTGATGAACAAGCTGGTGAATAACCTTGGCAGTGGAAGG	2100
681	SerSerGluGlnAsnArgAsnLeuMetAsnLysLeuValAsnAsnLeuGlySerGlyArg	700
2101	GAAGATGATGCCATTGTCTCTGGATGATGCCACCTCGTTTAACACGAGAGAGTTTGGGC	2160
701	GluAspAspAlaIleValLeuAspAspAlaThrSerPheAsnHisGluGluSerLeuGly	720
2161	CTGGAACTCATTCATGAGGAATCTGATGCTCCTTTGCTGCCCCAAGAGTATACTCCACC	2220
721	LeuGluLeuIleHisGluGluSerAspAlaProLeuLeuProProArgValTyrSerThr	740
2221	GAGAACCAACCCACACCAATTATACAGAAGCGGATCCCCAAGACCACAGTGAGAGC	2280
741	GluAsnHisGlnProHisHisTyrThrArgArgArgIleProGlnAspHisSerGluSer	760
2281	TTTTTCCCTTTGCTAACCAACGAGCACACAGAAGATCTCCAGTCACCCCATAGAGACTCT	2340
761	PhePheProLeuLeuThrAsnGluHisThrGluAspLeuGlnSerProHisArgAspSer	780
2341	CTCTATACCAGCATGCCGACACTGGCTGGTGTGGCCGACACAGAGAGTGTACCACAGC	2400
781	LeuTyrThrSerMetProThrLeuAlaGlyValAlaAlaThrGluSerValThrThrSer	800
2401	ACCCAGACCGAACCCCAACCGGCCAAATGTGGTGATGCCGAAGATGTTACTACAAAAGC	2460
801	ThrGlnThrGluProProProAlaLysCysGlyAspAlaGluAspValTyrTyrLysSer	820
2461	ATGCCAAACCTAGGCTCCAGAAACCACTCCATCAGCTGCATCTTACTACCAGCTAGGT	2520
821	MetProAsnLeuGlySerArgAsnHisValHisGlnLeuHisThrTyrTyrGlnLeuGly	840
2521	CGCGGCAGCAGTGATGGATTATAGTTCTCTCCAAACAAAGATGGGACCCCTCCCGAGGGA	2580
841	ArgGlySerSerAspGlyPheIleValProProAsnLysAspGlyThrProProGluGly	860
2581	AGTTCAAAGGACCGGCTCATTTGGTCACTAGTCTATAGAAGATGACACAGAAATTGGAA	2640
861	SerSerLysGlyProAlaHisLeuValThrSerLeu***	873
2641	CCAACAAAACCTGCTAACACCTTGTGACTGTTCTGAGTTGATATAAGCAGTGGTAATAAT	2700
873		873
2701	GTGTGTACTCCTAAATCTTTATGCTGTCTCTAAAGACAAACACAACTCTCAGACTTTT	2760
873		873
2761	TTTTTTTTTAAATGGGATTTTTAGGTACGCCAGGGGAGAAAGATAACTGCTAAAAATCCC	2820
873		873
2821	CTGTACCCCATCCTTTCTTGTCTTTCCTTCAGATGGAGACTTCATTATGTTAATGAA	2880
873		873
2881	CAAGATATGAAGAAAATGGCACTCATGTGGCCTGTGTAATTATGTTGTATGTTTAA	2940
873		873
2941	ACATCTCTGATGCTGTGTTACTAAAATTACAAGGACCTGCTTTTAAAGGCCAGAACAA	3000
873		873



3





4

1 1 EGSKGTKPPPAVSTTKIPPIITNIEPLPERFCEALDSKGIKWFOTQGRMMY HK05006  
1 1 ERPCPKGTRGTASVLCMIJSTGTWNPKGPDLSNCTSHWYNOLAQKIRSGGEN HK05006  
51 1 ASSLANELNKHKTGPPVFAAGDVSSSVRLMEQLVDILDAOLOELKPSFKDSA HK05006  
101 1 ARSLNKK - - - - - AMVETVNNLLQPIQALNARLDLTISDQLRAAT HK05006  
43 1 GRSYNNKLOKREKTCRAYLXAIYDVTVDNLLRPEALESWKHMMNSSEQAHTTAT HK05006  
151 80 MLLHTYERSAFVLADNLLKTDIVRENTDNIKLEVAARLSTEGNLEDLKFPPE HK05006  
201 201 MLLDPTLEEGAFVLADNLLKTPTRYSMPTENIYLEYAVLSTEGQIQDFKFPL HK05006  
130 1 NM-QHGSTIQLSANTLKQNGRNGEIRVAFVLYNM LGPYLSTENASMKLGT HK05006  
251 251 GIKGAGSSIQLSANTVYKONS RNLAKLVFI IYRISLGOFLSTENNTIKLGA HK05006  
179 1 BALS TNH SVI VNS PVI I TAA INK EFS NKVYLA DPVYFTVKHI KQS EENFN P HK05006  
301 301 DFI GRNST IAVNSHVISV SINK E -SSRVYLLTDPPVLEFTLPHI -DPPDNYFNA HK05006  
229 1 NCSFWSYSKRTMTGYWSTQGCRLT TNKTHTTTSCNHLTNFAVLM AHVEY HK05006  
349 1 NCSFWSYSERTMTMGYWSTQGCRLVDTNKTRTTCCACSHLTNFN ILM AHREI HK05006  
279 1 KHS DAVH D L L L D VITWVGILLSLVCLL ICI FTFCFFRGLQSDRNTIHKNL HK05006  
329 1 AYK DGVHE L L L L TVITWVGIV ISLVCLAICIFTFCFFRGLQSDRNTIHKNL HK05006  
329 1 CISLFVAELLFLLIGIMRTDQPIACAVFPA L L L H F F F F L A A F T W M F L E G V Q L Y HK05006  
449 1 C I N L F I A F F I F L I G I D K T K Y A I A C P I F A G L L H F F F F L A A F A W N C L E G V Q L Y HK05006  
379 1 M L V E V F E S E H S R R K Y F Y L V G Y G M P A L I V A V S A A V D Y R S Y G T D K V C W L R L HK05006  
499 1 L M L V E V F E S E Y S R K K X Y Y V A G Y L E P A T V V G V S A A I D Y K S Y G T E K A C W L H V HK05006



51

423 DTYFIWSEFIGPATLIIIMLNVIIFLGIALYKMFHRTAII LKPEISGCLDNIKSW HK05006  
549 DNYFIWSEFIGPVTFIILLNIIFLVITLCKMYKHSNTLKKPDSLSRL ENIKSW HK05490

479 VIGAIALLCLLGLTWA FGLMYINESTVIMAYLFTIFNLSLOQMFI FIFHCIV HK05006  
599 VLGAFALLCLLGLTWS FGLLFINEETIVMAYLFTIENAFQGVFI FIFHCIA HK05490

529 LQKKVRKEYGKCLR-THCCSGKSTESSIGSGKTSGSRTPG RYSTGSSQSR I HK05006  
649 LQKKVRKEYGKCFRHSYCCGGGLPTESPHSSV KASTTTRTSARYSSGTQSR I HK05490

578 RRMWNDTVRKQSESSFIITGDINSASLNREG L----- HK05006  
699 RRMWNDTVRKQSESSFISGDINS TSTLN- OGM TGNXLLLTNP LRLRPHGTNN HK05490

610 ----- LNNARDTSVMDTLP LNCNHCNSYS HK05006  
748 PYNTLLAETVVCNAPSAPVFNSPGHS LNNARDTSAMD TLP LNCN FNNSYS HK05490

634 IASGEYLSNCVQIIIDRGYNHNE TALEKKI LKELTSNYIPSY LNNHERSSE HK05006  
798 LHKGDY-ND SVQVYDCGLSLNDTAFENMI ISEL-----VHNNLRGSS HK05490

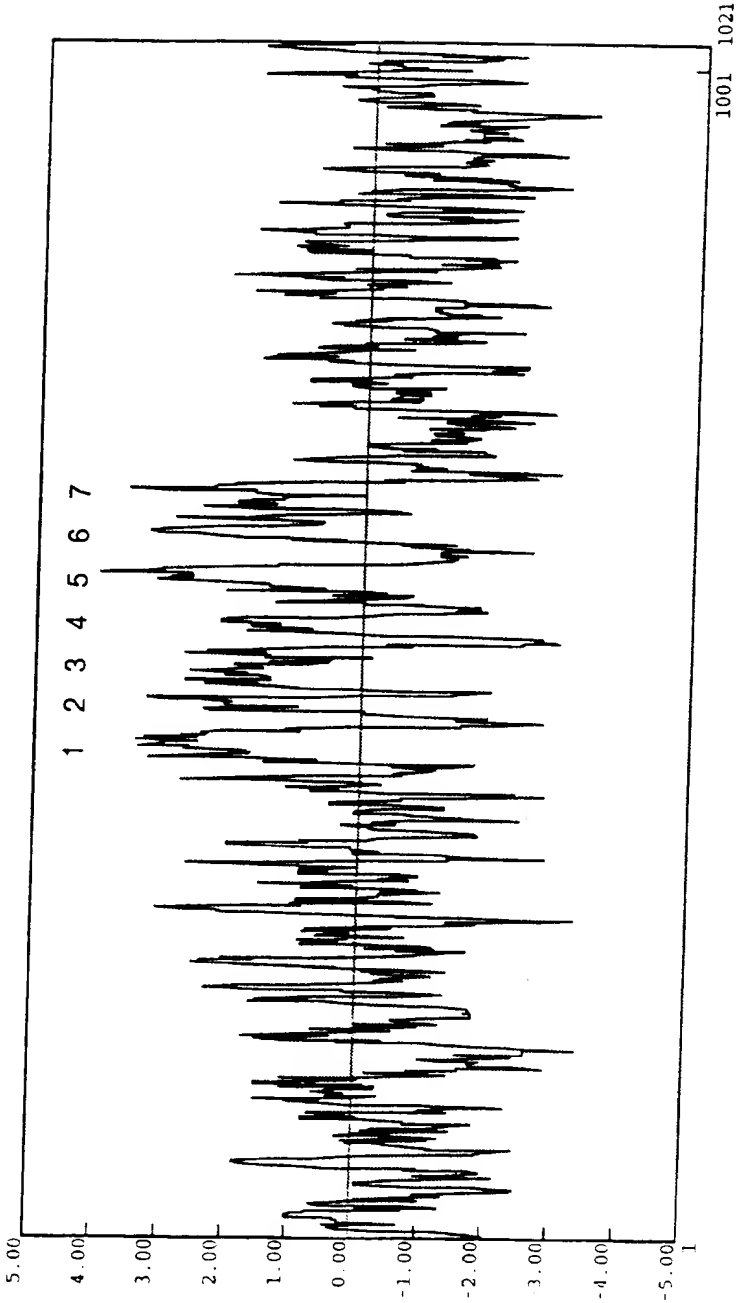
684 QNRNLMNKL VNN--LGSGREDDAIVLDDATSEFNHEESLGLELIH EESDAP HK05006  
839 KTHNLELTIPVKPVIGGSSSEDDAIVADASSLMHSDNPGLELH HKELEAP HK05490

732 LLPPRVYS TENHQPHHYTRRRIPQDHSSEFFP LLTNEHTEDLOSPH RDSL HK05006  
889 LIPOBTHSLI-YQPO---KKVKS EGTDSYVSQ LTAENEDHLOSPNRDSSL HK05490

782 YTSMP TLAGVAATESV TSTSTQTEPPPAKCCGDAEDVY YKSM PNLGSRNHVH HK05006  
934 YTSMPNL RDSPYPES-SPDMEEDLSPSRRSENE DIYKSM PNLGA--GH HK05490

832 QLHTY YQLGRGSSDGFIVPPPNKDGTPPEGSSK-GPAHLV TSL HK05006  
900 QLOHCYQISRGNSDGYIITIPINKEGCIPEGDMQLV TSL HK05490

⊗ 6





1 GAAGGAAGCAAGGGACAAACACACCTCCAGCAGTTTCTACAAACCAAAATTCACCTATA 60  
1 GluGlySerLysGlyThrLysProProProAlaValSerThrThrLysIleProProIle 20  
61 ACAAAATATTTTCCCTGCCAGAGAGATTCTGTGAAGCATTAGACTCCAAAGGGGATAAAG 120  
21 ThrAsnIlePheProLeuProGluArgPheCysGluAlaLeuAspSerLysGlyIleLys 40  
121 TGGCCTCAGACACAAAGGGGAATCATGTTGAACGACCATGCCCTAAGGGAACAAGAGGA 180  
41 TrpProGlnThrGlnArgGlyMetMetValGluArgProCysProLysGlyThrArgGly 60  
181 ACTGCCTCATATCTCTGCATGATTTCCACTGCAACATGGAACCCCTAAGGGCCCCGATCTT 240  
61 ThrAlaSerTyrLeuCysMetIleSerThrGlyThrTrpAsnProLysGlyProAspLeu 80  
241 AGCAACTGTACCTCAGCTGGTCAATCAGCTGGCTCAGAAGATCAGAAGCGGAGAAAAT 300  
81 SerAsnCysThrSerHisTrpValAsnGlnLeuAlaGlnLysIleArgSerGlyGluAsn 100  
301 GCTGCTAGTCTTGCCCAATGAACGTGGCTAAACATACCAAAGGGCCAGTGTTCGTGGGGAT 360  
101 AlaAlaSerLeuAlaAsnGluLeuAlaLysHisThrLysGlyProValPheAlaGlyAsp 120  
361 GTAAGTTCTTCAGTGAGATTGATGGAGCAGTTGTTGGACATCCTTTGATGCACAGCTGCAG 420  
121 ValSerSerSerValArgLeuMetGluGlnLeuValAspIleLeuAspAlaGlnLeuGln 140  
421 GAACGTAAACCTAGTGAATAAGATTTCAGCTGGAGCGGAGTTATAACAAGCTCCAAAAACGA 480  
141 GluLeuLysProSerGluLysAspSerAlaGlyArgSerTyrAsnLysLeuGlnLysArg 160



481 GAGAGACATGCAGGGCTTACCTTAGCCATTGTTGACACAGTGGACAACTTCTGAGA 540  
161 GluLysThrCysArgAlaIleLeuLysAlaIleValAspThrValAspAsnLeuLeuArg 180  
  
541 CCTGAAGCTTTGGAATCATGGAACATATGAATTTCTTCTGAACAGCACATATCTGCAACA 600  
181 ProGluAlaLeuGluSerTrpLysHisMetAsnSerSerGluGlnAlaHisThrAlaThr 200  
  
601 ATGTACTCTGATACATGGAAGAGAGCTTTTGTCTCTAGCTGACAAATCTTTAGAACCA 660  
201 MetLeuLeuAspThrLeuGluGluGlyAlaPheValLeuAlaAspAsnLeuGluPro 220  
  
661 ACAGGGTCTCAATGCCCCACAGACAGAAATATTTGCTCTGGAAGTTGCCGTACTCAGTACAGAA 720  
221 ThrArgValSerMetProThrGluAsnIleValLeuGluValAlaValLeuSerThrGlu 240  
  
721 GGACAGATCCAAGACTTTAATTTCTCTGGGCATCAAGGAGGAGGAGCTCATTCGAA 780  
241 GlyGlnIleGlnAspPheLysPheProLeuGlyIleLeuGlyAlaGlySerSerIleGln 260  
  
781 CTGTCCGCMAATACCGTCAACAGACAGACAGGAATGGCTTGCMAAGTTGGTCTTCATC 840  
261 LeuSerAlaAsnThrValLysGlnAsnSerArgAsnGlyLeuAlaLysLeuValPheIle 280  
  
841 ATTTACCGGAGCCTGGGACACTTCTTAGTACAGAAATGCAACCATTAACCTGGTGCT 900  
281 IleTyrArgSerLeuGlyGlnPheLeuSerThrGluAsnAlaThrIleLeuLeuGlyAla 300  
  
901 GATTTTATTCGTGTAATAGCACCATTCGAGTGAACCTCTCAGTCATTTTCAGTTTCATTC 960  
301 AspPheIleGlyArgAsnSerThrIleAlaValAsnSerHisValIleSerValSerIle 320  
  
961 AATAAGAGTCCAGCCGAGTATACCTGACTGATCCTCTGCTTTTACCTGCCACACATT 1020



OO



CO

321 AsnLysGluSerSerArgValTyrLeuThrAspProValLeuPheThrLeuProHisIle 340  
1021 GATCCTGACAAATTATTTCATGCAAACTGCTCTCTCGGAAGTACTACTCAGAGAGAACTATG 1080  
341 AspProAspAsnTyrPheAsnAlaAsnCysSerPheThrAsnTyrSerGluArgThrMet 360  
1081 ATGGGATATTGCTCTACCCAGGGCTGCAAGCTGGTTCACACTAATAAACTCGAACAAG 1140  
361 MetGlyTyrTrpSerThrGlnGlyCysLysLeuValAspThrAsnLysThrArgThrThr 380  
1141 TGTGATGCGAGCCACCTACCAATTTTGCAATTCATGCGCCACAGGCAAAATTCATAT 1200  
381 CysAlaCysSerHisLeuThrAsnPheAlaIleLeuMetAlaHisArgGluIleAlaTyr 400  
1201 AAAGATGGGTTTCATGAATTACTTCTTACAGTCATCACTGGGTGGGAATGTCAATTCC 1260  
401 LysAspGlyValHisGluLeuLeuLeuThrValIleThrTrpValGlyIleValIleSer 420  
1261 CTGTTTTCCTGGCTATCTGCATCTTCACCTTCTGCTTTTTCGGTGGCTACAGATGAC 1320  
421 LeuValCysLeuAlaIleCysIlePheThrPheCysPhePheArgGlyLeuGlnSerAsp 440  
1321 CGAATACTATTACAGAACCTTTTGTATCACCCTTTTCATTCGTCGAATTTATTTCTTA 1380  
441 ArgAsnThrIleHisLysAsnLeuCysIleAsnLeuPheIleAlaGluPheIlePheLeu 460  
1381 ATAGGCATTGATAGACAAATATGGATTGGATGGCATGCCAATATTTGCAGGACTTCTACAC 1440  
461 IleGlyIleAspLysThrLysTyrAlaIleAlaCysProIlePheAlaGlyLeuLeuHis 480

10/25



1 0

1441 TTTTCTTTTGGCAGCTTTTGCTTGGATGTGCTAGAAGGTGTGCAGCTCTACCTAATG 1500  
441 PhePhePheLeuAlaAlaPheAlaTrpMetCysLeuGluGlyValGlnLeuTyrLeuMet 500

1501 TTAGTTGAAGTTTGTGAAAGTGAATATTCAAGGAAAAATATTACTATGTGTGCTGGTTAC 1560  
501 LeuValGluValPheGluSerGluTyrSerArgLysLysTyrTyrTyrValAlaGlyTyr 520

1561 TTGTTTCTGTCACAGTGGTTGGAGTTTCAGCTGCTATTGACTATAAGAGCTATGGAACA 1620  
521 LeuPheProAlaThrValValGlyValSerAlaAlaIleAspTyrLysSerTyrGlyThr 540

1621 GAAAAAGCTTGTGGCTTCATGTTGATAACTACTTTATATGGAGCTTCATTGGACCTGTT 1680  
541 GluLysAlaCysTrpLeuHisValAspAsnTyrPheIleTrpSerPheIleGlyProVal 560

1681 ACCTTCATTATTCTGCTAAATATTATCTTCTTGGTGATCACATTGTGCAAAATGGTGAAG 1740  
561 ThrPheIleIleLeuLeuAsnIleIlePheLeuValIleThrLeuCysLysMetValLys 580

1741 CATTCAAACACTTTGAAACCAGATTCTAGCAGGTGGAAAACATTAAAGTCTTGGGTGCTT 1800  
581 HisSerAsnThrLeuLysProAspSerSerArgLeuGluAsnIleLysSerTrpValLeu 600

1801 GGCCTTTTGGCTCTTCTGTGCTTCTTGGCCTCACCTGGTCTTGGGTGCTTTTATT 1860  
601 GlyAlaPheAlaLeuLeuCysLeuLeuGlyLeuThrTrpSerPheGlyLeuLeuPheIle 620

1861 AATGAGGAGACTATTGTGATGGCATATCTCTTCACTATATTTAATGCTTCCAGGGAGTG 1920  
621 AsnGluGluThrIleValMetAlaTyrLeuPheThrIlePheAsnAlaPheGlnGlyVal 640

1921 TTCATTTTCATCTTTCACCTGTGCTCTCCAAAAGAAAGTACGAAAAGAATATGGCAAGTGC 1980  
641 PheIlePheIlePheHisCysAlaLeuGlnLysLysValArgLysGluTyrGlyLysCys 660



1 1

1981 TTCAGACACTCATCTACTGCTGTGGAGGCGCTCCAACTGAGAGTCCCCACAGTTCAGTGAAG 2040  
661 PheArgHisSerTyrCysCysGlyGlyLeuProThrGluSerProHisSerSerValLys 680

2041 GCATCAACCCAGAACCGAGTGTCTGCTATTCCTCTGGCACAGAGTCGTATTAAGAGA 2100  
681 AlaSerThrThrArgThrSerAlaArgTyrSerSerGlyThrGlnSerArgIleArgArg 700

2101 ATGTGGAATCATCTACTGTGAGAAAACAATCAGATCTTCTTTTATCTCAGGTGACATCAAT 2160  
701 MetTrpAsnAspThrValArgLysGlnSerGluSerSerPheIleSerGlyAspIleAsn 720

2161 AGCACTTCAACACTTAATCAAGGAATGACTGGCAATTACCTACTAAACAACCCCTCTTCTT 2220  
721 SerThrSerThrLeuAsnGlnGlyMetThrGlyAsnTyrLeuLeuThrAsnProLeuLeu 740

2221 CGACCCCGGCACTTAACAACCCCTATAACACATTTGCTCGTGAACAGTTTGTATGTAAT 2280  
741 ArgProHisGlyThrAsnAsnProTyrAsnThrLeuLeuAlaGluThrValValCysAsn 760

2281 GCCCTTCAGCTCCTGTATTTAACCTACCAAGGACATTCACGACAAATGCCAGGATACA 2340  
761 AlaProSerAlaProValPheAsnSerProGlyHisSerLeuAsnAsnAlaArgAspThr 780

2341 AGTGGCAGTGGTACTCTACCGCTAAATGTAATTTTAACAACAGCTACTCGCTGCACAG 2400  
781 SerAlaMetAspThrLeuProLeuAsnGlyAsnPheAsnAsnSerTyrSerLeuHisLys 800

2401 GGTCACTATAATGACAGCGTGCAAGTTGTGGACTGTGGACTAAGTCTGAATGATCTGCT 2460  
801 GlyAspTyrAsnAspSerValGlnValValAspCysGlyLeuSerLeuAsnAspThrAla 820



1 2

2461 TTGAGAAATGATCATTTTCAGATTAGTCACAACAACCTAAGGGCAGCAGCAAGACT 2520  
821 PheGluLysMetIleIleSerGluLeuValHisAsnAsnLeuArgGlySerSerLysThr 840

2521 CACAACCTCGAGCTCACGCTACCACTCAACCTGTGATTGGAGGTAGCAGCAGTGAAGAT 2580  
841 HisAsnLeuGluLeuThrLeuProValLysProValIleGlyGlySerSerGluAsp 860

2581 GATGCTATTGTGGCAGATGCTTTCATCTTTAATGCACAGCGACAACCCAGGGCTGGAGCTC 2640  
861 AspAlaIleValAlaAspAlaSerSerLeuMetHisSerAspAsnProGlyLeuGluLeu 880

2641 CATCACAAGAAGTGGAGGACCACCTTATTCCTCAGGGAGCTCAGTCCCTCTGTATCCAA 2700  
881 HisHisLysGluLeuGluAlaProLeuIleProGlnArgThrHisSerLeuLeuTyrGln 900

2701 CCCCAGAGAAGTGAAGTCCGAGGGAACTGACAGCTATGTCCTCCCACTGACAGCAGAG 2760  
901 ProGlnLysLysValLysSerGluGlyThrAspSerTyrValSerGlnLeuThrAlaGlu 920

2761 GCTGAAGATCACCTACAGTCCCCCAACAGAGACTCTCTTTATACAGCATGCCCAATCTT 2820  
921 AlaGluAspHisLeuGlnSerProAsnArgAspSerLeuTyrThrSerMetProAsnLeu 940

2821 AGAGACTCTCCCTATCCGGAGAGAGCCCTGCATGGAAGAGAACCTCTCTCCCTCCAGG 2880  
941 ArgAspSerProTyrProGluSerSerProAspMetGluAspLeuSerProSerArg 960

2881 AGCAGTGAGAATGAGGACATTTACTATAAAGCATGCCAAATCTTGGAGCTGGCCATCAG 2940  
961 ArgSerGluAsnGluAspIleTyrTyrLysSerMetProAsnLeuGlyAlaGlyHisGln 980



1 3

2941 CTTTCAGATGTCCTACCATCAGCAGGGGCAATAGTGATGTTATATATCCCCATTAAAC 3000  
981 LeuGlnMetCysTyrGlnIleSerArgGlyAsnSerAspGlyTyrIleIleProIleAsn 1000

3001 AAAGAAGGGTGTATTTCCAGAAGGAGATGTTAGAGAAGGACAAATGCAGCTGGTTACAAGT 3060  
1001 LysGluGlyCysIleProGluGlyAspValArgGluGlyGlnMetGlnLeuValThrSer 1020

3061 CTTTAAATCATACAGCTAAGGAATTCCAAGGGCCACATCGGAGTATTATAATAAAGACA 3120  
1021 Leu\*\*\* 1022

3121 CCATTGGCCTGACCGCAGCTCCCTCAAACTCTGCTTGAAGAGATGACTCTGTGACCTGTGGT 3180  
1022 1022

3181 TCTCTGGGTAAAAAAGATGACTGAACTTGCCTTGCAGTTCTGTGGAATTTTATAAAACATACA 3240  
1022 1022

3241 AAAACTTTGTATATACACAGAGTATTAATAAGTGAATTTATTGTACAAAGAAAAGAGAT 3300  
1022 1022

3301 GCCAGCCAGGTATTTTAAAGATTCGTGCTGCTGTTTAGAGAAATTTGTGAAACAAGCAAAACA 3360  
1022 1022

3361 AAACITTTCCAGGCCATTTTACTCGACGACTCTGTGGAAGTAAATTTGTAAATATGGCTGCAC 3420  
1022 1022



1 4

3421 CATTCTTGTAGGCGCTGCTATGTTATATATATACAGACGTAGCGCTTTAAATCTGTGGGAC 3480  
1022

3481 AAATTTACGTACCTTACTATTTCTGACAGACTTGGCAAGCGAGGAGATATTTCTGCA 3540  
1022

3541 TCAGTTTGCAGTTCACTGCAATCTTTTACATTAGCCAAAGATTGAAACATGCTTAAAC 3600  
1022

3601 CACTAGCAATCGAAGCCACAGGCCCTTATTTCTATATGTTTCTCACTGTACAAATGAACTAT 3660  
1022

3661 TCTCATGAAATAATGGCTAAAGCAATATATATTTTGTCTATTTCTGCTAGGTAATAATAATAC 3720  
1022

3721 ATTTGTGTCCACTGAATATATATTTGTCTATTAATAATTTTAAAGAGTGAAGAAATAT 3780  
1022

3781 TGTGAAGAAGCTCTTTGGTTGCCACATGTTATGAATGTTTTTCTTACACATTTGTGATGGTA 3840  
1022

3841 AGTTCTACTCATTTTCACTCTCTTTTCCACGTATACAGTGTCTGCTTTGACAAAGTTAG 3900  
1022

3901 TCTTTATTACTTACATTTAATTTCTTATTTGCCAAGAAACGGTGTTTTATGGGGAGAAAC 3960





1 5

1022  
3961 A A A C T C T T T G A A G C C A G T T A N G T C A T G C C T T G C A C A A A G T G A T G A A T C T A G A A A A G A T 4020  
1022  
4021 T G T G T G T C A C C C C T G T T A T T C T T G A A C A G A G G G C A A G A G G G C A C T G G G C A C T T T C T C A C 4080  
1022  
4081 A A A C T T T C T A G T G A C A A A A G G T G C C T A T T C T T T T T A A A A A A A A A T A A A A C A T A A A 4140  
1022  
4141 T A T T A C T C T T C C A T A T T G C C T T C T G C C T A T A T T A G T A A T T A A T T T A T T T A T G A T A A A G T 4200  
1022  
4201 T C T A A T G A A A N G T A A A T T G T T T C A G C A A A A T T C T G C T T T T T T T T C A T C C C T T T G T G T A A A 4260  
1022  
4261 C C T G T T A A T A T G A G C C C A T C A C T A A T A T C C A G T G T A A A G T T T A A C A C G G T T T G A C A G T A 4320  
1022  
4321 A A T A A A T G T G A A T T T T T T C A A G T 4343  
1022



1 6

	1				50
HK05006					
HK05490					
HH02631	MARLA AVLWN	LCVTAVLVTS	ATQGLSRAGL	PFGLMRRELA	CEGYPIELRC
	51				100
HK05006					
HK05490					
HH02631	PGSDVIMVEN	ANYGRTDDKI	CDADPFQMEN	VQCYLPDAFK	IMSQR CNRT
	101				150
HK05006					
HK05490					
HH02631	QCVVVAGSDA	FPDPCPGTYK	YLEVQYDCVP	YKVEQKV FVC	PGTLQKVLEP
	151				200
HK05006					
HK05490					
HH02631	TSTHESEHQS	GAWCKDPLQA	GDRIYVMPWI	PYRTDTL TEY	ASWEDYVAAR
	201				250
HK05006					
HK05490					
HH02631	HTTTYRLPNR	VDGTGFV VYD	GAVFYNKERT	RNIVKYDLRT	RIKSGETVIN
	251				300
HK05006					
HK05490					
HH02631	TANYHDTSPY	RWGGKTDIDL	AVDENGLWVI	YATEGNNGRL	VVSQ LNPYTL
	301				350
HK05006					
HK05490					
HH02631	RFEGTWETGY	DKRSASNAFM	VCGVLYVLRS	VYVDD DSEAA	GNRVDYAFNT



1 7

	351				400
HK05006	_____	_____	_____	_____	_____
HK05490	_____	_____	_____	_____	_____
HH02631	NANREEPVSL	TFPNPYQFIS	SVDYNPRDNQ	LYVWNNYFVV	RYSLEFGPPD
	401				450
HK05006	_____	_____	_____	_____	_____
HK05490	_____	_____	_____	_____	E
HH02631	PSAGPATSP	LSTTTTARPT	PLTSTASPAA	TTPLRRAPLT	THPVGAINQL
	451				500
HK05006	_____	_____	_____	_____	_____
HK05490	GSKGKPPPA	VSTTKIPPIT	NIFPLPERFC	EALDSKGIKW	PQTQRGMMVE
HH02631	GPDLPPATAP	VPSTRPPAP	NLHVSPFLFC	EPREVRVQW	PATQQGMLVE
	501				550
HK05006	_____	_____	_____	_____	_____
HK05490	RPCPKGTRGT	ASYLCMISTG	TWNPKGPDLS	NCTSHWVNQL	AQKIRSGENA
HH02631	RPCPKGTRGI	ASFQCLPALG	LWNPRGPDLS	NCTSPWVNQV	AQKIKSGENA
	551				600
HK05006	_____	AEQ	TRNHLNAGDI	TYSVRAMDQL	VGLLDVQLRN
HK05490	ASLANELAKH	TKGPVFAGDV	SSSVRLMEQL	VDILDAQLQE	LKPSEKDSAG
HH02631	ANIASELARH	TRGSIYAGDV	SSSVKLMEQL	LDILDAQLQA	LRPIERESAG
	601				650
HK05006	RSLN. ....	.....	KAM	VETVNNLLQP	QALNAWRDLT
HK05490	RSYNKLQKRE	KTCRAYLKAI	VDIVDNLLRP	EALSWKHMN	SSEQAHTATM
HH02631	KNYNKMHKRE	RTCKDYIKAV	VETVDNLLRP	EALSWKDMN	ATEQVHTATM
	651				700
HK05006	LLHTVEESAF	VLADNLLKTD	IVRENTDNIK	LEVARLSTEG	NLEDLKFP. E
HK05490	LLDTLEEGAF	VLADNLEPT	RVSMTPTENIV	LEVAVLSTEG	QIQDFKFPLG
HH02631	LLDVLEEGAF	LLADNVREPA	RFLAAKENVV	LEVTVLNTEG	QVQELVFPQE



1 8

701 750  
HK05006 NMGHGSTIQL SANTLKQNGR NGEIRVAFVL YNNLGPYLST ENASMKLGTE  
HK05490 IKGAGSSIQL SANTVKQNSR NGLAKLVFII YRSLGQFLST ENATIKLGAD  
HH02631 EYPRKNSIQL SAKTIKQNSR NGVVKVVFIL YNNLGLFLST ENATVKLAGE

751 800  
HK05006 A...LSTNHS VIVNSPVITA AINKEFSNKV YLADPVVFTV KHIKQSEENF  
HK05490 F...IGRNST IAVNSHVIVS SINKE. SSRV YLTDPVLFTL PHI. DPDNYF  
HH02631 AGPGGPGGAS LVVNSQVIAA SINKE. SSRV FLMDPVIFTV AHL. EDKNHF

801 850  
HK05006 NPNCSEFWSYS KRTMTGYWST QGCRLTTNK THTTCSCNHL TNFAVLMAHV  
HK05490 NANCSEFWNYS ERTMMGYWST QGCKLVDTNK TRTTCACSHL TNFAILMAHR  
HH02631 NANCSEFWNYS ERSMLGYWST QGCRLVESNK THTTCACSHL TNFAVLMAHR

851 900  
HK05006 EVKHSDAVHD LLLDVITWVG ILLSLVCLLI CIFTFCFFRG LQSDRNTIHK  
HK05490 EIAYKDGVEH LLLTVITWVG IVISLVCLAI CIFTFCFFRG LQSDRNTIHK  
HH02631 EI. YQGRINE LLLSVITWVG IVISLVCLAI CISTFCFLRG LQTDNRNTIHK

901 950  
HK05006 NLCISLFVAE LLFLIGINRT DQPIACAVFA ALLHFFFLAA FTWMFLEGVQ  
HK05490 NLCINLFIAE FIFLIGIDKT KYAIACPIFA GLLHFFFLAA FAWMCLEGVQ  
HH02631 NLCINLFLAE LLFLVGIDKT QYEIACPIFA GLLHYFFLAA FSWLCLEGVH

951 1000  
HK05006 LYIMLVEVFE SEHSRRKYFY LVGYGMPALI VAVSAAVDYR SYGTDKVCWL  
HK05490 LYLMLVEVFE SEYSRKKYYY VAGYLFPATV VGVSAADYK SYGTEKACWL  
HH02631 LYLLLVEVFE SEYSRTKYYY LGGYCFPALV VGIAAAIDYR SYGTEKACWL

1001 1050  
HK05006 RLDTYFIWSF IGPATLIIML NVIFLGIALY KMFHHTAILK PESGCLDNK  
HK05490 HVDNYFIWSF IGPVTFIILL NIIFLVITLC KMKHSNTLK PDSSRLNIK  
HH02631 RVDNYFIWSF IGPVSFVIVV NLVFLMVLTH KMIRSSSVLK PDSSRLDNK



	1051		1100
HK05006	SWVIGAIALL CLLGLTWAFG LMYINESTVI MAYLFTIFNS LOGMFIFIFH		
HK05490	SWVLGAFALL CLLGLTWSFG LLFINEETIV MAYLFTIFNA FQGVFIFIFH		
HH02631	SWALGAIALL FLLGLTWAFG LLFINKESVV MAYLFTTFNA FQGVFIFVFH		

	1101		1150
HK05006	CVLQKKVRKE YGKCLR. THC CSGKSTESSI GSGKTSQSRT PGRYSTGSQS		
HK05490	CALQKKVRKE YGKCFRHSYC CGGLPTESPH SSVKASTTRT SARYSSGTQS		
HH02631	CALQKKVHKE YSKCLRHSYC CIRSPPGGTH GSKTSAMRS NTRYTTGTQS		

	1151		1200
HK05006	RIRRMWNDTV RKQSESSFIT GDINSSASLN REGLLN....		
HK05490	RIRRMWNDTV RKQSESSFIS GDINSTSTLN QGMTGNYLLT NPLLRPHGTN		
HH02631	RIRRMWNDTV RKQTESSFMA GDINSTPTLN RGTMGNHLLT NPVLQPRGGT		

	1201		1250
HK05006	..... NARDTS VMDTLPLNGN		
HK05490	NPYNTLLAET VVCNAPSAPV FNSPGHSLN. .... NARDTS AMDTLPLNGN		
HH02631	SPYNTLIAES VGFNPSSPPV FNSPGSYREP KHPLGGREAC GMDTLPLNGN		

	1251		1300
HK05006	HGNSYSIASG EYLSN. CVQI IDRGINHNE. TALEKKILKE LTSNYIPSYL		
HK05490	FNNSYSLHKG DY. . NDSVQV VDCGLSLND. TAFEKMIISE LVHN... NL		
HH02631	FNNSYSLRSG DFPPGGGPE PPRGRNLADA AAFEKMIISE LVHN... NL		

	1301		1350
HK05006	NNHERSSEQN RNLMNKLVPN LGSGREDDAI VLDDATSFNH EESLGLELIH		
HK05490	RGSSKTHN. . LETLTPVKPV IGGSSSEDDA IVADASSLMH SDNPGLELHH		
HH02631	RGSSSAAGP PPPEPPVPPV PGGGEE... .. EAGGPGG ADRAEIELLY		

	1351		1400
HK05006	EESDAPLLPP RVYSTENHQP HHYTRRRIPQ DHSEFFPLL TNEHTEDLQS		
HK05490	KELEAPLIPQ RTHSL.... LYQPQKKVKS EGTDSYVSQ L TAEADHLQS		
HH02631	KALEEPLLLP RAQSV.... LYQSD... L DESESCAED GATSRPLSSP		



2 0

1401 1450  
HK05006 PHRDSLYTSM PTLAGVAATE SVTTSTQTE. . . PPPAKCGD AEDVYYKSM.  
HK05490 PNRDSLYTSM PNLRDSP. YP ESSPDMEEDL . . . SPSRRSE NEDIYYKSM.  
HH02631 PGRDSLYASG ANLRDSPSYP DSSPEGPSEA LPPPPPAPPG PPEIYYTSRP

1451 1500  
HK05006 PNLGSRNHVH QLHTYYQLGR GSSDGFIVPP NKDGTPEGS . SKGPAHLVT  
HK05490 PNLGAG. . . H QLQMCYQISR GNSDGYIIP I NKEGCIPEGD VREGQMLVT  
HH02631 PALVAR. . . N PLQGYQVRR PSHEGYLAAP GLEGPGPDGD . . . GQMQLVT

1501  
HK05006 SL  
HK05490 SL  
HH02631 SL

☒ 2 1

TTTTTTTTTTTTTTTTTCTAATTTTGGTCGGCGGCGGTGCTGGGCCAG	50
GGGAAGGAAGGGACACGGAGGCCGCCCTCGTCCCGCCACCTCCTACCCGC	100
TTCCCCCAGCCCCGGCTCCGGGAGATGTGCCGGGCGGGGGCCCCGGGTT	150
CGCCGAGCCGCAGGAGAGACACGCTGGGCCGACCCAGAGAGGCGCTGGA	200
CAGGCTGGTGGTCCAGGCCGTGGTGCCTGCCAGGTGATGTGGGGCAAAGC	250
CCCCCGCACAGGCCACTGAGAGCTCCGGACACGCACCCGGCTGCCACCAT	300
GGCCCGCCTAGCCGCAGTGCTCTGGAATCTGTGTGTCACCGCCGTCCTGG	350
TCACCTCGGCCACCCAAGGCCTGAGCCGGGCCGGGCTCCCGTTCCGGGCTG	400
ATGCGCCGGGAGCTGGCGTGTGAAGGCTACCCCATCGAGCTGCGGTGCCC	450
CGGCAGCGACGTCATCATGGTGGAGAATGCCAACTACGGGCGCACGGACG	500
ACAAGATTTGCGATGCTGACCCTTTCCAGATGGAGAATGTGCAGTGCTAC	550
CTGCCGGACGCCTTCAAGATCATGTACAGAGGTGTAACAACCGCACCCA	600
GTGCGTGGTGGTCCGGGCTCGGATGCCTTTCTGACCCCTGTCCTGGGA	650
CCTACAAGTACCTGGAGGTGCAGTACGACTGTGTCCCCTACAAAGTGGAG	700
CAGAAAGTCTTCGTGTGCCCAGGGACCTGCAGAAGGTGCTGGAGCCAC	750
CTCGACACACGAGTCAGAGCACCAGTCTGGCGCATGGTGCAAGGACCCGC	800
TGCAGGCGGGTGACCGCATCTACGTGATGCCCTGGATCCCCTACCGCACG	850
GACACACTGACTGAGTATGCCTCGTGGGAGGACTACGTGGCCGCCCGCCA	900
CACCACCACCTACCGCTGCCCAACCGCGTGGATGGCACAGGCTTTGTGG	950
TCTACGATGGTGCCGTCTTCTACAACAAGGAGCGCACGCGCAACATCGTC	1000
AAGTATGACCTACGGACGCGCATCAAGAGCGGGGAGACGGTCATCAATAC	1050
CGCCAACTACCATGACACCTCGCCCTACCGCTGGGGCGGAAAGACCGACA	1100
TTGACCTGGCGGTGGACGAGAACGGGCTGTGGGTCTACGCCACTGAG	1150
GGCAACAACGGGCGGCTGGTGGTGAGCCAGCTGAACCCCTACACACTGCG	1200
CTTTGAGGGCACGTGGGAGACGGGTTACGACAAGCGCTCGGCATCCAACG	1250
CCTTCATGGTGTGTGGGGTCTGTACGTCCTGCGCTCCGTGTACGTGGAT	1300
GATGACAGCGAGGCGGCTGGCAACCGCGTGGACTATGCCTTCAACACCAA	1350
TGCCAACCGCGAGGAGCCTGTCAGCCTCACCTTCCCCAACCCCTACCAGT	1400
TCATCTCCTCCGTTGACTACAACCTCGCGACAACCAGCTGTACGTCTGG	1450
AACAATAATTTTCGTGGTGGCTACAGCCTGGAGTTCGGGCCGCCCGACCC	1500
CAGTGCTGGCCCAGCCACTTCCCCACCCCTCAGCACGACCACCACAGCCA	1550
GGCCCACGCCCCCTACCCAGCACAGCCTCGCCCGCAGCCACCACCCCGCTC	1600
CGCCGGGCACCCCTACCCAGCACCCAGTGGGTGCCATCAACCAGCTGGG	1650
ACCTGATCTGCCTCCAGCCACAGCCCCAGTCCCCAGCACCCGGCGGCCCC	1700
CAGCCCCGAATCTACACGTGTCCCCTGAGCTCTTCTGCGAGCCCCGAGAG	1750



2 2

GTACGGCGGGTCCAGTGGCCGGCCACCCAGCAGGGCATGCTGGTGGAGAG 1800  
GCCCTGCCCCAAGGGGACTCGAGGAATTGCCTCCTTCCAGTGTCTACCAG 1850  
CCTTGGGGCTCTGGAACCCCGGGGCCCTGACCTCAGCAACTGCACCTCC 1900  
CCCTGGGTCAACCAGGTGGCCGAGAAGATCAAGAGTGGGGAGAACGCGGC 1950  
CAACATCGCCAGCGAGCTGGCCCGACACACCCGGGGCTCCATCTACGCGG 2000  
GGGACGTCTCCTCCTCTGTGAAGCTGATGGAGCAGCTGCTGGACATCCTG 2050  
GATGCCCAGCTGCAGGCCCTGCGGCCCATCGAGCGCGAGTCAGCCGGCAA 2100  
GAACTACAACAAGATGCACAAGCGAGAGAGAACTTGTAAGGATTATATCA 2150  
AGGCCGTGGTGGAGACAGTGGACAATCTGCTCCGGCCAGAAGCTCTGGAG 2200  
TCCTGGAAGGACATGAATGCCACGGAGCAGGTGCACACGGCCACCATGCT 2250  
CCTCGACGTCTGGAGGAGGGCGCCTTCTGCTGGCCGACAATGTCAGGG 2300  
AGCCTGCCCGCTTCTGGCTGCCAAGGAGAACGTGGTCTGGAGGTCACA 2350  
GTCCTGAACACAGAGGGCCAGGTGCAGGAGCTGGTGTTCCTCCAGGAGGA 2400  
GTACCCGAGAAAGAACTCCATCCAGCTGTCTGCCAAAACCATCAAGCAGA 2450  
ACAGCCGCAATGGGGTGGTCAAAGTTGTCTTCATCCTCTACAACAACCTG 2500  
GGCCTCTTCTGTCCACGGAGAATGCCACAGTGAAGCTGGCCGGCGAAGC 2550  
AGGCCCGGGTGGCCCTGGGGGCGCCTCTCTAGTGGTGAAGTCACAGGTCA 2600  
TCGCAGCATCCATCAACAAGGAGTCCAGCCGCGTCTTCTCATGGACCCT 2650  
GTCATCTTCACCGTGGCCACCTGGAGGACAAGAACCACCTTCAATGCTAA 2700  
CTGCTCCTTCTGGAAGTACTCGGAGCGTTCCATGCTGGGCTATTGGTCGA 2750  
CCCAAGGCTGCCGCTGGTGGAGTCCAACAAGACCCATACCACGTGTGCC 2800  
TGCAGCCACCTACCAACTTCGCTGTGCTCATGGCTCACCGTGAGATCTA 2850  
CCAGGGCCGCATCAACGAGCTGCTGCTGTGGTTCATCACCTGGGTGGGCA 2900  
TTGTGATCTCCCTGGTCTGCTTGGCCATCTGCATCTCCACCTTCTGCTTC 2950  
CTGCGGGGGCTGCAGACCGACCGCAACACCATCCACAAGAACCTGTGCAT 3000  
CAACCTCTTCTGGCTGAGCTGCTCTTCTGGTCGGGATCGACAAGACTC 3050  
AGTATGAGATTGCCTGCCCCATCTTCGCCGGCCTGCTGCACTATTTCTTC 3100  
CTGGCTGCCCTTCTCCTGGCTGTGCCTGGAGGGCGTGACCTCTACCTGCT 3150  
ACTAGTGGAGGTGTTTTGAGAGCGAGTATCCCGCACCAAGTACTACTACC 3200  
TGGGTGGCTACTGCTTCCCGGCCCTGGTGGTGGGCATCGCGGCTGCCATT 3250  
GACTACCGCAGCTACGGCACCGAGAAGGCCTGCTGGCTCCGAGTGGACAA 3300  
TTACTTCATCTGGAGTTTCATCGGGCCAGTCTCCTTCGTTATCGTGGTCA 3350  
ACCTGGTGTTCCTCATGGTGACCTGCACAAGATGATCCGAAGCTCATCT 3400  
GTGCTCAAGCCCGACTCCAGCCGCTGGACAACATTAAATCCTGGGCGCT 3450  
GGGGGCCATCGCGCTGCTGTTCTGCTGGGCCTCACCTGGGCTTTCGGCC 3500





2 3

TCCTCTTCATCAACAAGGAGTCGGTGGTCATGGCCTATCTCTTCACCACC 3550  
TTCAACGCCTTCCAGGGGGTCTTCATCTTCGTCTTTCACTGCGCCTTACA 3600  
GAAGAAGGTGCACAAGGAGTACAGCAAGTGCCTGCGTCACTCCTACTGCT 3650  
GCATCCGCTCCCCACCCGGGGGCACTCACGGATCCCTCAAGACCTCAGCC 3700  
ATGCGAAGCAACACCCGCTACTACACAGGGACCCAGAGCCGAATTCCGGAG 3750  
GATGTGGAATGACACTGTGAGGAAACAGACGGAGTCCTCCTTCATGGCGG 3800  
GTGACATCAACAGCACCCCCACCCTGAACCGAGGTACCATGGGGAACCAC 3850  
CTGCTGACCAACCCCGTGCTGCAGCCCCGTGGGGGCACCAGTCCCTACAA 3900  
CACCTCATCGCCGAGTCAGTGGGCTTCAATCCCTCCTCGCCCCCTGTCT 3950  
TCAACTCCCCAGGGAGCTACCGGGAACCCAAGCACCCCTTGGGAGGCCGG 4000  
GAAGCCTGTGGCATGGACACCCTGCCCTGAACGGCAACTTCAATAACAG 4050  
TTACTCCTTGCGAAGTGGGGATTTCCCTCCCGGGGATGGGGGCCCTGAGC 4100  
CGCCCCGAGGCCGGAACCTAGCCGATGCGGGGCCCTTTGAGAAGATGATC 4150  
ATCTCAGAGCTGGTGCACAACAACCTGCGGGGGAGCAGCAGCGCGGCCAA 4200  
GGGCCCTCCACCGCCTGAGCCCCCTGTGCCACCTGTGCCAGGGGGCGGGG 4250  
GCGAGGAAGAGGCGGGCGGGCCCGGGGTGCTGACCGGGCCGAGATTGAA 4300  
CTTCTCTATAAGGCCCTGGAGGAGCCTCTGCTGCTGCCCCGGGCCAGTC 4350  
GGTGTGTACCAGAGCGATCTGGACGAGTCGGAGAGCTGCACGGCCGAGG 4400  
ACGGGCCACCAGCGGCCCTCTCCTCCCCTCCTGGCCGGGACTCCCTC 4450  
TATGCCAGCGGGGCCAACCTGCGGGACTCACCTCCTACCCGGACAGCAG 4500  
CCCTGAGGGGCCAGTGAGGCCCTGCCCCACCCCTCCCGCACCCCCCG 4550  
GCCCCCGGAAATCTACTACACCTCGCGCCCGCCAGCCCTGGTGGCCCGG 4600  
AATCCCCTGCAGGGCTACTACCAGGTGCGGCGTCCTAGCCACGAGGGCTA 4650  
CCTGGCAGCCCCAGGCCTTGAGGGGCCAGGGCCCGATGGGGACGGGCAGA 4700  
TGCAGCTGGTACCAGTCTCTGAGGGCACCTCATGGACCAGGGGCTGGTG 4750  
GCCCAGGCCAGGGAGGGAACCCTGGGCAGGGCTCTGGTGGGAGAGGGAGA 4800  
CAGATGGAGGCAGTGGCTGGTGGGCCACTCTCTCCAGGTGCCCTCAGCC 4850  
ATGGGCCCTACAGTCCCCTCAGGGGACTCTAACCTGGGGGCTGAGGTGC 4900  
CAGGGTTCACAGACAGGGTTTCCCACCAGCCACACGCACCAGCTCTATTT 4950  
GGGGGAAGTGTAGTGAGGAGGAGCCCAGAGGACCCAGGGGAGTGAGGAG 5000  
GGAGAACTTGAAGGGTGCAGCCCACTTCCAGACTCTCCCTCTCCCACC 5050  
CTTCTACCCTGTGAAGGGAAATGAGGGCTTTAGTTTCTGGGCAGGGAGG 5100  
GGCAGCTTCTGAGGTTGCCAAAGGCCCCCACTGGATGGAACCTGTTAGCT 5150  
GCTCCTCTCCGCAGCCAGAAATGCTGCCGGCTGCACCCAGAGGGAGCAGT 5200  
GAGGCAGGACAGATGGACAGGTTCTCCTGCGCTGTAATTCCTGCTCCC 5250

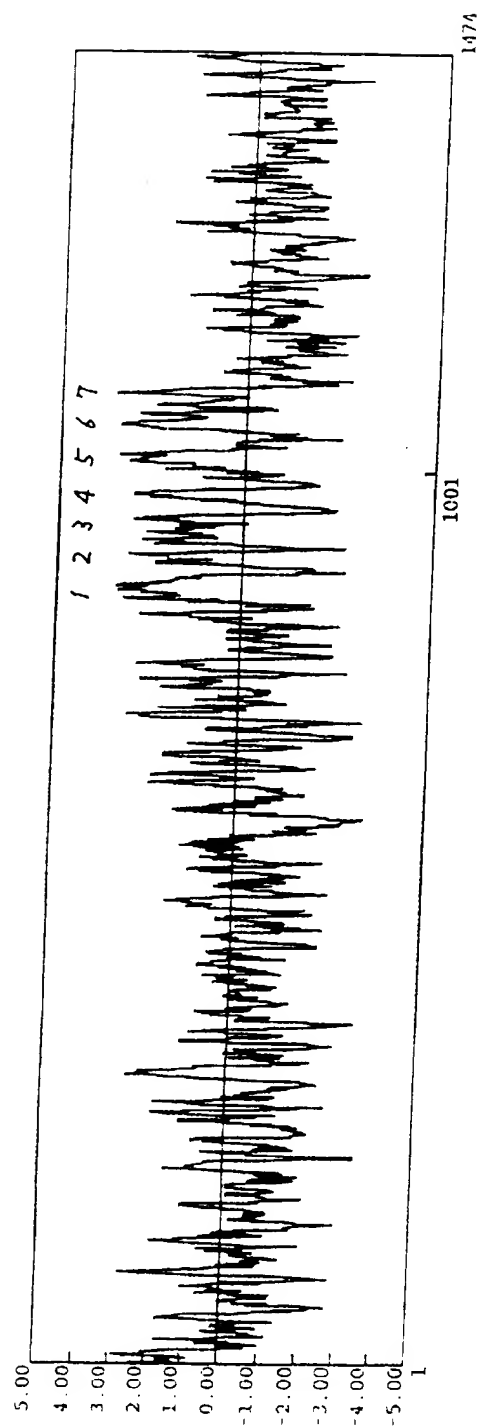


2 4

TGGAGACTGGGAAAAGCCCGCAGGGCAGGGGGACTGGGCGGTGGTGGCTG	5300
GTGGTTTAAAGGTTGAACTTTCTCTGAAGCTCCTTTCCCCTTGCTCTTG	5350
TCCCTGCCCCGCAAGCAAACCTGCCCCCTCTGCCTCCCAGTGCACCCAAT	5400
GACCCCCTCCCTTGGGGCGACTCCTGATGAAGCACAACCCCCGCAGGGC	5450
CCCCAGCCACAGGGGTGGCCATATTTGGGCAGTCCCAGTCCTGTGGGC	5500
TGGGCTATCTGGGGAGCAGATTTTGGGTCTGGATCTCCCTGGGGAGTGGG	5550
TCCTGGGCTTGGATCTTTCCCTAGGGGGCCCTCTTACTCCTTCCTCTCTC	5600
CTCCTCCTTCCCCATTGCTGTAAATATTTCAACGAAATGGAAAAGAAAAA	5650
AAAAAAGAC	5659



2 5



## SEQUENCE LISTING

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> Novel G Protein Coupled Receptor Protein and Its Use

<130> A99137

<150> JP 10-207579

<151> 1998-07-23

<150> JP 10-225060

<151> 1998-08-07

<150> JP 10-284328

<151> 1998-10-06

<160> 6

<210> 1

<211> 872

<212> PRT

<213> Human

<400> 1

Ala Glu Gln Thr Arg Asn His Leu Asn Ala Gly Asp Ile Thr Tyr Ser

1 5 10 15

Val Arg Ala Met Asp Gln Leu Val Gly Leu Leu Asp Val Gln Leu Arg

20 25 30

Asn Leu Thr Pro Gly Gly Lys Asp Ser Ala Ala Arg Ser Leu Asn Lys

35 40 45

Ala Met Val Glu Thr Val Asn Asn Leu Leu Gln Pro Gln Ala Leu Asn  
50 55 60  
Ala Trp Arg Asp Leu Thr Thr Ser Asp Gln Leu Arg Ala Ala Thr Met  
65 70 75 80  
Leu Leu His Thr Val Glu Glu Ser Ala Phe Val Leu Ala Asp Asn Leu  
85 90 95  
Leu Lys Thr Asp Ile Val Arg Glu Asn Thr Asp Asn Ile Lys Leu Glu  
100 105 110  
Val Ala Arg Leu Ser Thr Glu Gly Asn Leu Glu Asp Leu Lys Phe Pro  
115 120 125  
Glu Asn Met Gly His Gly Ser Thr Ile Gln Leu Ser Ala Asn Thr Leu  
130 135 140  
Lys Gln Asn Gly Arg Asn Gly Glu Ile Arg Val Ala Phe Val Leu Tyr  
145 150 155 160  
Asn Asn Leu Gly Pro Tyr Leu Ser Thr Glu Asn Ala Ser Met Lys Leu  
165 170 175  
Gly Thr Glu Ala Leu Ser Thr Asn His Ser Val Ile Val Asn Ser Pro  
180 185 190  
Val Ile Thr Ala Ala Ile Asn Lys Glu Phe Ser Asn Lys Val Tyr Leu  
195 200 205  
Ala Asp Pro Val Val Phe Thr Val Lys His Ile Lys Gln Ser Glu Glu  
210 215 220  
Asn Phe Asn Pro Asn Cys Ser Phe Trp Ser Tyr Ser Lys Arg Thr Met  
225 230 235 240  
Thr Gly Tyr Trp Ser Thr Gln Gly Cys Arg Leu Leu Thr Thr Asn Lys  
245 250 255

Thr His Thr Thr Cys Ser Cys Asn His Leu Thr Asn Phe Ala Val Leu  
260 265 270

Met Ala His Val Glu Val Lys His Ser Asp Ala Val His Asp Leu Leu  
275 280 285

Leu Asp Val Ile Thr Trp Val Gly Ile Leu Leu Ser Leu Val Cys Leu  
290 295 300

Leu Ile Cys Ile Phe Thr Phe Cys Phe Phe Arg Gly Leu Gln Ser Asp  
305 310 315 320

Arg Asn Thr Ile His Lys Asn Leu Cys Ile Ser Leu Phe Val Ala Glu  
325 330 335

Leu Leu Phe Leu Ile Gly Ile Asn Arg Thr Asp Gln Pro Ile Ala Cys  
340 345 350

Ala Val Phe Ala Ala Leu Leu His Phe Phe Phe Leu Ala Ala Phe Thr  
355 360 365

Trp Met Phe Leu Glu Gly Val Gln Leu Tyr Ile Met Leu Val Glu Val  
370 375 380

Phe Glu Ser Glu His Ser Arg Arg Lys Tyr Phe Tyr Leu Val Gly Tyr  
385 390 395 400

Gly Met Pro Ala Leu Ile Val Ala Val Ser Ala Ala Val Asp Tyr Arg  
405 410 415

Ser Tyr Gly Thr Asp Lys Val Cys Trp Leu Arg Leu Asp Thr Tyr Phe  
420 425 430

Ile Trp Ser Phe Ile Gly Pro Ala Thr Leu Ile Ile Met Leu Asn Val  
435 440 445

Ile Phe Leu Gly Ile Ala Leu Tyr Lys Met Phe His His Thr Ala Ile  
450 455 460

Leu Lys Pro Glu Ser Gly Cys Leu Asp Asn Ile Lys Ser Trp Val Ile  
465 470 475 480  
Gly Ala Ile Ala Leu Leu Cys Leu Leu Gly Leu Thr Trp Ala Phe Gly  
485 490 495  
Leu Met Tyr Ile Asn Glu Ser Thr Val Ile Met Ala Tyr Leu Phe Thr  
500 505 510  
Ile Phe Asn Ser Leu Gln Gly Met Phe Ile Phe Ile Phe His Cys Val  
515 520 525  
Leu Gln Lys Lys Val Arg Lys Glu Tyr Gly Lys Cys Leu Arg Thr His  
530 535 540  
Cys Cys Ser Gly Lys Ser Thr Glu Ser Ser Ile Gly Ser Gly Lys Thr  
545 550 555 560  
Ser Gly Ser Arg Thr Pro Gly Arg Tyr Ser Thr Gly Ser Gln Ser Arg  
565 570 575  
Ile Arg Arg Met Trp Asn Asp Thr Val Arg Lys Gln Ser Glu Ser Ser  
580 585 590  
Phe Ile Thr Gly Asp Ile Asn Ser Ser Ala Ser Leu Asn Arg Glu Gly  
595 600 605  
Leu Leu Asn Asn Ala Arg Asp Thr Ser Val Met Asp Thr Leu Pro Leu  
610 615 620  
Asn Gly Asn His Gly Asn Ser Tyr Ser Ile Ala Ser Gly Glu Tyr Leu  
625 630 635 640  
Ser Asn Cys Val Gln Ile Ile Asp Arg Gly Tyr Asn His Asn Glu Thr  
645 650 655  
Ala Leu Glu Lys Lys Ile Leu Lys Glu Leu Thr Ser Asn Tyr Ile Pro  
660 665 670

Ser Tyr Leu Asn Asn His Glu Arg Ser Ser Glu Gln Asn Arg Asn Leu  
675 680 685

Met Asn Lys Leu Val Asn Asn Leu Gly Ser Gly Arg Glu Asp Asp Ala  
690 695 700

Ile Val Leu Asp Asp Ala Thr Ser Phe Asn His Glu Glu Ser Leu Gly  
705 710 715 720

Leu Glu Leu Ile His Glu Glu Ser Asp Ala Pro Leu Leu Pro Pro Arg  
725 730 735

Val Tyr Ser Thr Glu Asn His Gln Pro His His Tyr Thr Arg Arg Arg  
740 745 750

Ile Pro Gln Asp His Ser Glu Ser Phe Phe Pro Leu Leu Thr Asn Glu  
755 760 765

His Thr Glu Asp Leu Gln Ser Pro His Arg Asp Ser Leu Tyr Thr Ser  
770 775 780

Met Pro Thr Leu Ala Gly Val Ala Ala Thr Glu Ser Val Thr Thr Ser  
785 790 795 800

Thr Gln Thr Glu Pro Pro Pro Ala Lys Cys Gly Asp Ala Glu Asp Val  
805 810 815

Tyr Tyr Lys Ser Met Pro Asn Leu Gly Ser Arg Asn His Val His Gln  
820 825 830

Leu His Thr Tyr Tyr Gln Leu Gly Arg Gly Ser Ser Asp Gly Phe Ile  
835 840 845

Val Pro Pro Asn Lys Asp Gly Thr Pro Pro Glu Gly Ser Ser Lys Gly  
850 855 860

Pro Ala His Leu Val Thr Ser Leu  
865 870



&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 2616

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 2

GCTGAACAGA CAAGAAATCA CTTGAATGCT GGGGACATCA CCTACTCTGT CCGGGCCATG 60  
GACCAGCTGG TAGGCCTCCT AGATGTACAG CTTCGGAAC TGAACCCAGG TGGAAAAGAT 120  
AGTGCTGCCC GGAGTTTGAA CAAGGCAATG GTCGAGACAG TTAACAACCT CCTTCAGCCA 180  
CAAGCTTTGA ATGCATGGAG AGACCTGACT ACGAGTGATC AGCTGCGTGC GGCCACCATG 240  
TTGCTTCATA CTGTGGAGGA AAGTGCTTTT GTGCTGGCTG ATAACCTTTT GAAGACTGAC 300  
ATTGTCAGGG AGAATACAGA CAATATTAAA TTGGAAGTTG CAAGACTGAG CACAGAAGGA 360  
AACTTAGAAG ACCTAAAATT TCCAGAAAAC ATGGGCCATG GAAGCACTAT CCAGCTGTCT 420  
GCAAATACCT TAAAGCAAAA TGGCCGAAAT GGAGAGATCA GAGTGGCCTT TGTCTGTAT 480  
AACAACCTGG GTCCTTATTT ATCCACGGAG AATGCCAGTA TGAAGTTGGG AACGGAAGCT 540  
TTGTCCACAA ATCATTCTGT TATTGTCAAT TCCCCTGTTA TTACGGCAGC AATAAACAAA 600  
GAGTTCAGTA ACAAGGTTTA TTTGGCTGAT CCTGTGGTAT TTAGTGTTAA ACATATCAAG 660  
CAGTCAGAGG AAAATTTCAA CCCTAACTGT TCATTTTGA GCTACTCAA GCGTACAATG 720  
ACAGGTTATT GGTCAACACA AGGCTGTCGG CTCCTGACAA CAAATAAGAC ACATACTACA 780  
TGCTCTTGTA ACCACCTAAC AAATTTTGCA GTACTGATGG CACATGTGGA AGTTAAGCAC 840  
AGTGATGCGG TCCATGACCT CCTTCTGGAT GTGATCACGT GGGTTGGAAT TTTGCTGTCC 900  
CTTGTTTGTC TCCTGATTTG CATCTTCACA TTTTGCTTTT TCCGCGGGCT CCAGAGTGAC 960  
CGTAACACCA TCCACAAGAA CCTCTGCATC AGTCTCTTTG TAGCAGAGCT GCTCTTCCTG 1020  
ATTGGGATCA ACCGAACTGA CCAACCAATT GCCTGTGCTG TTTTCGCTGC CCTGTTTTCT 1080  
TCTTCTTGGC TGCCTTCACC TGGATGTTCC TGGAGGGGGT GCAGCTTTAT ATACATCATG 1140  
CTGGTGGAGG TTTTGTAGAG TGAACATTCA CGTAGGAAAT ACTTTTATCT GGTCGGCTAT 1200  
GGGATGCCTG CACTCATTGT GGCTGTGTCA GCTGCAGTAG ACTACAGGAG TTATGGAACA 1260

GATAAAGTAT GTTGGCTCCG ACTTGACACC TACTTCATTT GGAGTTTTAT AGGACCAGCA 1320  
ACTTTGATAA TTATGCTTAA TGTAATCTTC CTTGGGATTG CTTTATATAA AATGTTTCAT 1380  
CATACTGCTA TACTGAAACC TGAATCAGGC TGTCTTGATA ACATCAAGTC ATGGGTTATA 1440  
GGTGCAATAG CTCTTCTCTG CCTATTAGGA TTGACCTGGG CCTTTGGACT CATGTATATT 1500  
AATGAAAGCA CAGTCATCAT GGCCTATCTC TTCACCATTT TCAATTCTCT ACAGGGAATG 1560  
TTTATATTTA TTTTCCATTG TGTCTACAG AAGAAGGTAC GAAAAGAGTA TGGGAAATGC 1620  
CTGCGAACAC ATTGCTGTAG TGGCAAAAGT ACAGAGAGTT CCATTGGTTC AGGGAAAACA 1680  
TCTGGTTCTC GAACTCCTGG ACGCTACTCC ACAGGCTCAC AGAGCCGAAT CCGTAGAATG 1740  
TGGAATGACA CGGTTGAAA GCAGTCAGAG TCTTCCTTTA TTA CTGGAGA CATAAACAGT 1800  
TCAGCGTCAC TCAACAGAGA GGGGCTTCTG AACAATGCCA GGGATACAAG TGTCATGGAT 1860  
ACTCTACCAC TGAATGGTAA CCATGGCAAT AGTTACAGCA TTGCCAGCGG CGAATACCTG 1920  
AGCAACTGTG TGCAAATCAT AGACCGTGGC TATAACCATA ACGAGACCGC CCTAGAGAAA 1980  
AAGATTCTGA AGGAACTCAC TTCCA ACTAT ATCCCTTCTT ACCTGAACAA CCATGAGCGC 2040  
TCCAGTGAAC AGAACAGGAA TCTGATGAAC AAGCTGGTGA ATAACTTGG CAGTGGAAGG 2100  
GAAGATGATG CCATTGTCCT GGATGATGCC ACCTCGTTTA ACCACGAGGA GAGTTTGGGC 2160  
CTGGA ACTCA TTCATGAGGA ATCTGATGCT CCTTTGCTGC CCCCAGAGT ATACTCCACC 2220  
GAGAACCACC AGCCACACCA TTATACCAGA AGGCGGATCC CCAAGACCA CAGTGAGAGC 2280  
TTTTTCCCTT TGCTAACCAA CGAGCACACA GAAGATCTCC AGTCACCCCA TAGAGACTCT 2340  
CTCTATACCA GCATGCCGAC ACTGGCTGGT GTGGCCGCCA CAGAGAGTGT TACCACCAGC 2400  
ACCCAGACCG AACCCCAACC GGCCAAATGT GGTGATGCCG AAGATGTTTA CTACAAAAGC 2460  
ATGCCAAACC TAGGCTCCAG AAACCACGTC CATCAGCTGC ATACTTACTA CCAGCTAGGT 2520  
CGCGGCAGCA GTGATGGATT TATAGTTCCT CCAAACAAAG ATGGGACCCC TCCCAGGGGA 2580  
AGTTCAAAAG GACCGGCTCA TTTGGTCACT AGTCTA 2616

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 1021

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 3

Glu Gly Ser Lys Gly Thr Lys Pro Pro Pro Ala Val Ser Thr Thr Lys

1 5 10 15

Ile Pro Pro Ile Thr Asn Ile Phe Pro Leu Pro Glu Arg Phe Cys Glu

20 25 30

Ala Leu Asp Ser Lys Gly Ile Lys Trp Pro Gln Thr Gln Arg Gly Met

35 40 45

Met Val Glu Arg Pro Cys Pro Lys Gly Thr Arg Gly Thr Ala Ser Tyr

50 55 60

Leu Cys Met Ile Ser Thr Gly Thr Trp Asn Pro Lys Gly Pro Asp Leu

65 70 75 80

Ser Asn Cys Thr Ser His Trp Val Asn Gln Leu Ala Gln Lys Ile Arg

85 90 95

Ser Gly Glu Asn Ala Ala Ser Leu Ala Asn Glu Leu Ala Lys His Thr

100 105 110

Lys Gly Pro Val Phe Ala Gly Asp Val Ser Ser Ser Val Arg Leu Met

115 120 125

Glu Gln Leu Val Asp Ile Leu Asp Ala Gln Leu Gln Glu Leu Lys Pro

130 135 140

Ser Glu Lys Asp Ser Ala Gly Arg Ser Tyr Asn Lys Leu Gln Lys Arg

145 150 155 160

Glu Lys Thr Cys Arg Ala Tyr Leu Lys Ala Ile Val Asp Thr Val Asp

165 170 175

Asn Leu Leu Arg Pro Glu Ala Leu Glu Ser Trp Lys His Met Asn Ser

180 185 190

Ser Glu Gln Ala His Thr Ala Thr Met Leu Leu Asp Thr Leu Glu Glu  
195 200 205  
Gly Ala Phe Val Leu Ala Asp Asn Leu Leu Glu Pro Thr Arg Val Ser  
210 215 220  
Met Pro Thr Glu Asn Ile Val Leu Glu Val Ala Val Leu Ser Thr Glu  
225 230 235 240  
Gly Gln Ile Gln Asp Phe Lys Phe Pro Leu Gly Ile Lys Gly Ala Gly  
245 250 255  
Ser Ser Ile Gln Leu Ser Ala Asn Thr Val Lys Gln Asn Ser Arg Asn  
260 265 270  
Gly Leu Ala Lys Leu Val Phe Ile Ile Tyr Arg Ser Leu Gly Gln Phe  
275 280 285  
Leu Ser Thr Glu Asn Ala Thr Ile Lys Leu Gly Ala Asp Phe Ile Gly  
290 295 300  
Arg Asn Ser Thr Ile Ala Val Asn Ser His Val Ile Ser Val Ser Ile  
305 310 315 320  
Asn Lys Glu Ser Ser Arg Val Tyr Leu Thr Asp Pro Val Leu Phe Thr  
325 330 335  
Leu Pro His Ile Asp Pro Asp Asn Tyr Phe Asn Ala Asn Cys Ser Phe  
340 345 350  
Trp Asn Tyr Ser Glu Arg Thr Met Met Gly Tyr Trp Ser Thr Gln Gly  
355 360 365  
Cys Lys Leu Val Asp Thr Asn Lys Thr Arg Thr Thr Cys Ala Cys Ser  
370 375 380  
His Leu Thr Asn Phe Ala Ile Leu Met Ala His Arg Glu Ile Ala Tyr  
385 390 395 400

Lys Asp Gly Val His Glu Leu Leu Leu Thr Val Ile Thr Trp Val Gly

405

410

415

Ile Val Ile Ser Leu Val Cys Leu Ala Ile Cys Ile Phe Thr Phe Cys

420

425

430

Phe Phe Arg Gly Leu Gln Ser Asp Arg Asn Thr Ile His Lys Asn Leu

435

440

445

Cys Ile Asn Leu Phe Ile Ala Glu Phe Ile Phe Leu Ile Gly Ile Asp

450

455

460

Lys Thr Lys Tyr Ala Ile Ala Cys Pro Ile Phe Ala Gly Leu Leu His

465

470

475

480

Phe Phe Phe Leu Ala Ala Phe Ala Trp Met Cys Leu Glu Gly Val Gln

485

490

495

Leu Tyr Leu Met Leu Val Glu Val Phe Glu Ser Glu Tyr Ser Arg Lys

500

505

510

Lys Tyr Tyr Tyr Val Ala Gly Tyr Leu Phe Pro Ala Thr Val Val Gly

515

520

525

Val Ser Ala Ala Ile Asp Tyr Lys Ser Tyr Gly Thr Glu Lys Ala Cys

530

535

540

Trp Leu His Val Asp Asn Tyr Phe Ile Trp Ser Phe Ile Gly Pro Val

545

550

555

560

Thr Phe Ile Ile Leu Leu Asn Ile Ile Phe Leu Val Ile Thr Leu Cys

565

570

575

Lys Met Val Lys His Ser Asn Thr Leu Lys Pro Asp Ser Ser Arg Leu

580

585

590

Glu Asn Ile Lys Ser Trp Val Leu Gly Ala Phe Ala Leu Leu Cys Leu

595

600

605

Leu Gly Leu Thr Trp Ser Phe Gly Leu Leu Phe Ile Asn Glu Glu Thr  
610 615 620  
Ile Val Met Ala Tyr Leu Phe Thr Ile Phe Asn Ala Phe Gln Gly Val  
625 630 635 640  
Phe Ile Phe Ile Phe His Cys Ala Leu Gln Lys Lys Val Arg Lys Glu  
645 650 655  
Tyr Gly Lys Cys Phe Arg His Ser Tyr Cys Cys Gly Gly Leu Pro Thr  
660 665 670  
Glu Ser Pro His Ser Ser Val Lys Ala Ser Thr Thr Arg Thr Ser Ala  
675 680 685  
Arg Tyr Ser Ser Gly Thr Gln Ser Arg Ile Arg Arg Met Trp Asn Asp  
690 695 700  
Thr Val Arg Lys Gln Ser Glu Ser Ser Phe Ile Ser Gly Asp Ile Asn  
705 710 715 720  
Ser Thr Ser Thr Leu Asn Gln Gly Met Thr Gly Asn Tyr Leu Leu Thr  
725 730 735  
Asn Pro Leu Leu Arg Pro His Gly Thr Asn Asn Pro Tyr Asn Thr Leu  
740 745 750  
Leu Ala Glu Thr Val Val Cys Asn Ala Pro Ser Ala Pro Val Phe Asn  
755 760 765  
Ser Pro Gly His Ser Leu Asn Asn Ala Arg Asp Thr Ser Ala Met Asp  
770 775 780  
Thr Leu Pro Leu Asn Gly Asn Phe Asn Asn Ser Tyr Ser Leu His Lys  
785 790 795 800  
Gly Asp Tyr Asn Asp Ser Val Gln Val Val Asp Cys Gly Leu Ser Leu  
805 810 815

Asn Asp Thr Ala Phe Glu Lys Met Ile Ile Ser Glu Leu Val His Asn

820

825

830

Asn Leu Arg Gly Ser Ser Lys Thr His Asn Leu Glu Leu Thr Leu Pro

835

840

845

Val Lys Pro Val Ile Gly Gly Ser Ser Ser Glu Asp Asp Ala Ile Val

850

855

860

Ala Asp Ala Ser Ser Leu Met His Ser Asp Asn Pro Gly Leu Glu Leu

865

870

875

880

His His Lys Glu Leu Glu Ala Pro Leu Ile Pro Gln Arg Thr His Ser

885

890

895

Leu Leu Tyr Gln Pro Gln Lys Lys Val Lys Ser Glu Gly Thr Asp Ser

900

905

910

Tyr Val Ser Gln Leu Thr Ala Glu Ala Glu Asp His Leu Gln Ser Pro

915

920

925

Asn Arg Asp Ser Leu Tyr Thr Ser Met Pro Asn Leu Arg Asp Ser Pro

930

935

940

Tyr Pro Glu Ser Ser Pro Asp Met Glu Glu Asp Leu Ser Pro Ser Arg

945

950

955

960

Arg Ser Glu Asn Glu Asp Ile Tyr Tyr Lys Ser Met Pro Asn Leu Gly

965

970

975

Ala Gly His Gln Leu Gln Met Cys Tyr Gln Ile Ser Arg Gly Asn Ser

980

985

990

Asp Gly Tyr Ile Ile Pro Ile Asn Lys Glu Gly Cys Ile Pro Glu Gly

995

1000

1005

Asp Val Arg Glu Gly Gln Met Gln Leu Val Thr Ser Leu

1010

1015

1020

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 3063

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 4

GAAGGAAGCA AAGGGACAAA ACCACCTCCA GCAGTTTCTA CAACCAAAAT TCCACCTATA 60  
ACAAATATTT TTCCCCTGCC AGAGAGATTC TGTGAAGCAT TAGACTCCAA GGGGATAAAG 120  
TGGCCTCAGA CACAAAGGGG AATGATGGTT GAACGACCAT GCCCTAAGGG AACAAGAGGA 180  
ACTGCCTCAT ATCTCTGCAT GATTTCCACT GGAACATGGA ACCCTAAGGG CCCCgATCTT 240  
AGCAACTGTA CCTCACACTG GGTGAATCAG CTGGCTCAGA AGATCAGAAG CGGAGAAAAT 300  
GCTGCTAGTC TTGCCAATGA ACTGGCTAAA CATAccAAAG GGCCAGTGTT TGCTGGGGAT 360  
GTAAGTTCTT CAGTGAGATT GATGGAGCAG TTGGTGGACA TCCTTGATGC ACAGCTGCAG 420  
GAACTGAAAC CTAGTGA AAA AGATTCAGCT GGACGGAGTT ATAACAAGCT CCAAAAACGA 480  
GAGAAGACAT GCAGGGCTTA CCTTAAGGCA ATTGTTGACA CAGTGGACAA CCTTCTGAGA 540  
CCTGAAGCTT TGAATCATG GAAACATATG AATTCTTCTG AACAAGCACA TACTGCAACA 600  
ATGTTACTCG ATACATTGGA AGAAGGAGCT TTTGTCCTAG CTGACAATCT TTTAGAACCA 660  
ACAAGGGTCT CAATGCCAC AGAAAATATT GTCCTGGAAG TTGCCGTACT CAGTACAGAA 720  
GGACAGATCC AAGACTTTAA ATTCCTCTG GGCATCAAAG GAGCAGGCAG CTCAATCCAA 780  
CTGTCCGCAA ATACCGTCAA ACAGAACAGC AGGAATGGGC TTGCAAAGTT GGTGTTTCATC 840  
ATTACCGGA GCCTGGGACA GTTCCTTAGT ACAGAAAATG CAACCATTAA ACTGGGTGCT 900  
GATTTTATTG GTCGTAATAG CACCATTGCA GTGAACTCTC ACGTCATTTT AGTTTCAATC 960  
AATAAAGAGT CCAGCCGAGT ATACCTGACT GATCCTGTGC TTTTACCCT GCCACACATT 1020  
GATCCTGACA ATTATTTCAA TGCAAACTGC TCCTTCTGGA ACTACTCAGA GAGAACTATG 1080  
ATGGGATATT GGTCTACCCA GGGCTGCAAG CTGGTTGACA CTAATAAAAC TCGAACAACG 1140  
TGTGCATGCA GCCACCTAAC CAATTTTGCA ATTCTCATGG CCCACAGGGA AATTGCATAT 1200  
AAAGATGGCG TTCATGAATT ACTTCTTACA GTCATCACCT GGGTGGGAAT TGTCATTTC 1260  
CTTGTTTGCC TGGCTATCTG CATCTTCACC TTCTGCTTTT TCCGTGGCCT ACAGAGTGAC 1320



CGAAATACTA TTCACAAGAA CCTTTGTATC AACCTTTTCA TTGCTGAATT TATTTTCCTA 1380  
ATAGGCATTG ATAAGACAAA ATATGCGATT GCATGCCCAA TATTTGCAGG ACTTCTACAC 1440  
TTTTTCTTTT TGGCAGCTTT TGCTTGGATG TGCCTAGAAG GTGTGCAGCT CTACCTAATG 1500  
TTAGTTGAAG TTTTGTAAAG TGAATATTCA AGGAAAAAAT ATTACTATGT TGCTGGTTAC 1560  
TTGTTTCCTG CCACAGTGGT TGGAGTTTCA GCTGCTATTG ACTATAAGAG CTATGGAACA 1620  
GAAAAAGCTT GCTGGCTTCA TGTTGATAAC TACTTTATAT GGAGCTTCAT TGGACCTGTT 1680  
ACCTTCATTA TTCTGCTAAA TATTATCTTC TTGGTGATCA CATTGTGCAA AATGGTGAAG 1740  
CATTCAAACA CTTTGAAACC AGATTCTAGC AGGTTGGAAA ACATTAAGTC TTGGGTGCTT 1800  
GGCGCTTTTCG CTCTTCTGTG TCTTCTTGGC CTCACCTGGT CCTTGGGTT GCTTTTTATT 1860  
AATGAGGAGA CTATTGTGAT GGCATATCTC TTCACTATAT TTAATGCTTT CCAGGGAGTG 1920  
TTCATTTTCA TCTTTCCTG TGCTCTCCAA AAGAAAGTAC GAAAAGAATA TGGCAAGTGC 1980  
TTCAGACACT CATACTGCTG TGGAGGCCTC CCAACTGAGA GTCCCCACAG TTCAGTGAAG 2040  
GCATCAACCA CCAGAACCAG TGCTCGCTAT TCCTCTGGCA CACAGAGTCG TATAAGAAGA 2100  
ATGTGGAATG ATACTGTGAG AAAACAATCA GAATCTTCTT TTATCTCAGG TGACATCAAT 2160  
AGCACTTCAA CACTTAATCA AGGAATGACT GGCAATTACC TACTAACAAA CCCTCTTCTT 2220  
CGACCCACAG GCACTAACAA CCCCTATAAC ACATTGCTCG CTGAAACAGT TGTATGTAAT 2280  
GCCCCCTCAG CTCCTGTATT TAACTACCA GGACATTAC TGAACAATGC CAGGGATACA 2340  
AGTGCCATGG ATACTCTACC GCTAAATGGT AATTTTAACA ACAGCTACTC GCTGCACAAG 2400  
GGTGACTATA ATGACAGCGT GCAAGTTGTG GACTGTGGAC TAAGTCTGAA TGATACTGCT 2460  
TTTGAGAAAA TGATCATTTT AGAATTAGTG CACAACAAC TACGGGGCAG CAGCAAGACT 2520  
CACAACCTCG AGCTCAGCT ACCAGTCAA CCTGTGATTG GAGGTAGCAG CAGTGAAGAT 2580  
GATGCTATTG TGGCAGATGC TTCATCTTTA ATGCACAGCG ACAACCCAGG GCTGGAGCTC 2640  
CATCACAAG AACTCGAGGC ACCACTTATT CCTCAGCGGA CTCACTCCCT TCTGTACCAA 2700  
CCCCAGAAGA AAGTGAAGTC CGAGGGAAC TACAGCTATG TCTCCCACT GACAGCAGAG 2760  
GCTGAAGATC ACCTACAGTC CCCCAACAGA GACTCTCTTT ATACAAGCAT GCCCAATCTT 2820  
AGAGACTCTC CCTATCCGGA GAGCAGCCCT GACATGGAAG AAGACCTCTC TCCCTCCAGG 2880

AGGAGTGAGA ATGAGGACAT TTACTATAAA AGCATGCCAA ATCTTGGAGC TGGCCATCAG 2940  
CTTCAGATGT GCTACCAGAT CAGCAGGGGC AATAGTGATG GTTATATAAT CCCCATTAAC 3000  
AAAGAAGGGT GTATTCCAGA AGGAGATGTT AGAGAAGGAC AAATGCAGCT GGTTACAAG 3060  
CTT 3063

<210> 5

<211> 1474

<212> PRT

<213> Human

<400> 5

Met Ala Arg Leu Ala Ala Val Leu Trp Asn Leu Cys Val Thr Ala Val

5

10

15

Leu Val Thr Ser Ala Thr Gln Gly Leu Ser Arg Ala Gly Leu Pro Phe

20

25

30

Gly Leu Met Arg Arg Glu Leu Ala Cys Glu Gly Tyr Pro Ile Glu Leu

35

40

45

Arg Cys Pro Gly Ser Asp Val Ile Met Val Glu Asn Ala Asn Tyr Gly

50

55

60

Arg Thr Asp Asp Lys Ile Cys Asp Ala Asp Pro Phe Gln Met Glu Asn

65

70

75

80

Val Gln Cys Tyr Leu Pro Asp Ala Phe Lys Ile Met Ser Gln Arg Cys

85

90

95

Asn Asn Arg Thr Gln Cys Val Val Val Ala Gly Ser Asp Ala Phe Pro

100

105

110

Asp Pro Cys Pro Gly Thr Tyr Lys Tyr Leu Glu Val Gln Tyr Asp Cys

115

120

125

Val Pro Tyr Lys Val Glu Gln Lys Val Phe Val Cys Pro Gly Thr Leu

130	135	140	
Gln Lys Val Leu Glu Pro Thr Ser Thr His Glu Ser Glu His Gln Ser			
145	150	155	160
Gly Ala Trp Cys Lys Asp Pro Leu Gln Ala Gly Asp Arg Ile Tyr Val			
165	170	175	
Met Pro Trp Ile Pro Tyr Arg Thr Asp Thr Leu Thr Glu Tyr Ala Ser			
180	185	190	
Trp Glu Asp Tyr Val Ala Ala Arg His Thr Thr Thr Tyr Arg Leu Pro			
195	200	205	
Asn Arg Val Asp Gly Thr Gly Phe Val Val Tyr Asp Gly Ala Val Phe			
210	215	220	
Tyr Asn Lys Glu Arg Thr Arg Asn Ile Val Lys Tyr Asp Leu Arg Thr			
225	230	235	240
Arg Ile Lys Ser Gly Glu Thr Val Ile Asn Thr Ala Asn Tyr His Asp			
245	250	255	
Thr Ser Pro Tyr Arg Trp Gly Gly Lys Thr Asp Ile Asp Leu Ala Val			
260	265	270	
Asp Glu Asn Gly Leu Trp Val Ile Tyr Ala Thr Glu Gly Asn Asn Gly			
275	280	285	
Arg Leu Val Val Ser Gln Leu Asn Pro Tyr Thr Leu Arg Phe Glu Gly			
290	295	300	
Thr Trp Glu Thr Gly Tyr Asp Lys Arg Ser Ala Ser Asn Ala Phe Met			
305	310	315	320
Val Cys Gly Val Leu Tyr Val Leu Arg Ser Val Tyr Val Asp Asp Asp			
325	330	335	
Ser Glu Ala Ala Gly Asn Arg Val Asp Tyr Ala Phe Asn Thr Asn Ala			

340 345 350  
Asn Arg Glu Glu Pro Val Ser Leu Thr Phe Pro Asn Pro Tyr Gln Phe  
355 360 365  
Ile Ser Ser Val Asp Tyr Asn Pro Arg Asp Asn Gln Leu Tyr Val Trp  
370 375 380  
Asn Asn Tyr Phe Val Val Arg Tyr Ser Leu Glu Phe Gly Pro Pro Asp  
385 390 395 400  
Pro Ser Ala Gly Pro Ala Thr Ser Pro Pro Leu Ser Thr Thr Thr Thr  
405 410 415  
Ala Arg Pro Thr Pro Leu Thr Ser Thr Ala Ser Pro Ala Ala Thr Thr  
420 425 430  
Pro Leu Arg Arg Ala Pro Leu Thr Thr His Pro Val Gly Ala Ile Asn  
435 440 445  
Gln Leu Gly Pro Asp Leu Pro Pro Ala Thr Ala Pro Val Pro Ser Thr  
450 455 460  
Arg Arg Pro Pro Ala Pro Asn Leu His Val Ser Pro Glu Leu Phe Cys  
465 470 475 480  
Glu Pro Arg Glu Val Arg Arg Val Gln Trp Pro Ala Thr Gln Gln Gly  
485 490 495  
Met Leu Val Glu Arg Pro Cys Pro Lys Gly Thr Arg Gly Ile Ala Ser  
500 505 510  
Phe Gln Cys Leu Pro Ala Leu Gly Leu Trp Asn Pro Arg Gly Pro Asp  
515 520 525  
Leu Ser Asn Cys Thr Ser Pro Trp Val Asn Gln Val Ala Gln Lys Ile  
530 535 540  
Lys Ser Gly Glu Asn Ala Ala Asn Ile Ala Ser Glu Leu Ala Arg His

545                      550                      555                      560  
Thr Arg Gly Ser Ile Tyr Ala Gly Asp Val Ser Ser Ser Val Lys Leu  
565                      570                      575  
Met Glu Gln Leu Leu Asp Ile Leu Asp Ala Gln Leu Gln Ala Leu Arg  
580                      585                      590  
Pro Ile Glu Arg Glu Ser Ala Gly Lys Asn Tyr Asn Lys Met His Lys  
595                      600                      605  
Arg Glu Arg Thr Cys Lys Asp Tyr Ile Lys Ala Val Val Glu Thr Val  
610                      615                      620  
Asp Asn Leu Leu Arg Pro Glu Ala Leu Glu Ser Trp Lys Asp Met Asn  
625                      630                      635                      640  
Ala Thr Glu Gln Val His Thr Ala Thr Met Leu Leu Asp Val Leu Glu  
645                      650                      655  
Glu Gly Ala Phe Leu Leu Ala Asp Asn Val Arg Glu Pro Ala Arg Phe  
660                      665                      670  
Leu Ala Ala Lys Glu Asn Val Val Leu Glu Val Thr Val Leu Asn Thr  
675                      680                      685  
Glu Gly Gln Val Gln Glu Leu Val Phe Pro Gln Glu Glu Tyr Pro Arg  
690                      695                      700  
Lys Asn Ser Ile Gln Leu Ser Ala Lys Thr Ile Lys Gln Asn Ser Arg  
705                      710                      715                      720  
Asn Gly Val Val Lys Val Val Phe Ile Leu Tyr Asn Asn Leu Gly Leu  
725                      730                      735  
Phe Leu Ser Thr Glu Asn Ala Thr Val Lys Leu Ala Gly Glu Ala Gly  
740                      745                      750  
Pro Gly Gly Pro Gly Gly Ala Ser Leu Val Val Asn Ser Gln Val Ile

755	760	765	
Ala Ala Ser Ile Asn Lys Glu Ser Ser Arg Val Phe Leu Met Asp Pro			
770	775	780	
Val Ile Phe Thr Val Ala His Leu Glu Asp Lys Asn His Phe Asn Ala			
785	790	795	800
Asn Cys Ser Phe Trp Asn Tyr Ser Glu Arg Ser Met Leu Gly Tyr Trp			
805	810	815	
Ser Thr Gln Gly Cys Arg Leu Val Glu Ser Asn Lys Thr His Thr Thr			
820	825	830	
Cys Ala Cys Ser His Leu Thr Asn Phe Ala Val Leu Met Ala His Arg			
835	840	845	
Glu Ile Tyr Gln Gly Arg Ile Asn Glu Leu Leu Leu Ser Val Ile Thr			
850	855	860	
Trp Val Gly Ile Val Ile Ser Leu Val Cys Leu Ala Ile Cys Ile Ser			
865	870	875	880
Thr Phe Cys Phe Leu Arg Gly Leu Gln Thr Asp Arg Asn Thr Ile His			
885	890	895	
Lys Asn Leu Cys Ile Asn Leu Phe Leu Ala Glu Leu Leu Phe Leu Val			
900	905	910	
Gly Ile Asp Lys Thr Gln Tyr Glu Ile Ala Cys Pro Ile Phe Ala Gly			
915	920	925	
Leu Leu His Tyr Phe Phe Leu Ala Ala Phe Ser Trp Leu Cys Leu Glu			
930	935	940	
Gly Val His Leu Tyr Leu Leu Leu Val Glu Val Phe Glu Ser Glu Tyr			
945	950	955	960
Ser Arg Thr Lys Tyr Tyr Tyr Leu Gly Gly Tyr Cys Phe Pro Ala Leu			

965	970	975	
Val Val Gly Ile Ala Ala Ala Ile Asp Tyr Arg Ser Tyr Gly Thr Glu			
980	985	990	
Lys Ala Cys Trp Leu Arg Val Asp Asn Tyr Phe Ile Trp Ser Phe Ile			
995	1000	1005	
Gly Pro Val Ser Phe Val Ile Val Val Asn Leu Val Phe Leu Met Val			
1010	1015	1020	
Thr Leu His Lys Met Ile Arg Ser Ser Ser Val Leu Lys Pro Asp Ser			
1025	1030	1035	1040
Ser Arg Leu Asp Asn Ile Lys Ser Trp Ala Leu Gly Ala Ile Ala Leu			
1045	1050	1055	
Leu Phe Leu Leu Gly Leu Thr Trp Ala Phe Gly Leu Leu Phe Ile Asn			
1060	1065	1070	
Lys Glu Ser Val Val Met Ala Tyr Leu Phe Thr Thr Phe Asn Ala Phe			
1075	1080	1085	
Gln Gly Val Phe Ile Phe Val Phe His Cys Ala Leu Gln Lys Lys Val			
1090	1095	1100	
His Lys Glu Tyr Ser Lys Cys Leu Arg His Ser Tyr Cys Cys Ile Arg			
1105	1110	1115	1120
Ser Pro Pro Gly Gly Thr His Gly Ser Leu Lys Thr Ser Ala Met Arg			
1125	1130	1135	
Ser Asn Thr Arg Tyr Tyr Thr Gly Thr Gln Ser Arg Ile Arg Arg Met			
1140	1145	1150	
Trp Asn Asp Thr Val Arg Lys Gln Thr Glu Ser Ser Phe Met Ala Gly			
1155	1160	1165	
Asp Ile Asn Ser Thr Pro Thr Leu Asn Arg Gly Thr Met Gly Asn His			

1170	1175	1180	
Leu Leu Thr Asn Pro Val	Leu Gln Pro Arg Gly Gly Thr Ser Pro Tyr		
1185	1190	1195	1200
Asn Thr Leu Ile Ala Glu Ser Val Gly Phe Asn Pro Ser Ser Pro Pro			
	1205	1210	1215
Val Phe Asn Ser Pro Gly Ser Tyr Arg Glu Pro Lys His Pro Leu Gly			
1220	1225	1230	
Gly Arg Glu Ala Cys Gly Met Asp Thr Leu Pro Leu Asn Gly Asn Phe			
1235	1240	1245	
Asn Asn Ser Tyr Ser Leu Arg Ser Gly Asp Phe Pro Pro Gly Asp Gly			
1250	1255	1260	
Gly Pro Glu Pro Pro Arg Gly Arg Asn Leu Ala Asp Ala Ala Ala Phe			
1265	1270	1275	1280
Glu Lys Met Ile Ile Ser Glu Leu Val His Asn Asn Leu Arg Gly Ser			
	1285	1290	1295
Ser Ser Ala Ala Lys Gly Pro Pro Pro Pro Glu Pro Pro Val Pro Pro			
1300	1305	1310	
Val Pro Gly Gly Gly Gly Glu Glu Glu Ala Gly Gly Pro Gly Gly Ala			
1315	1320	1325	
Asp Arg Ala Glu Ile Glu Leu Leu Tyr Lys Ala Leu Glu Glu Pro Leu			
1330	1335	1340	
Leu Leu Pro Arg Ala Gln Ser Val Leu Tyr Gln Ser Asp Leu Asp Glu			
1345	1350	1355	1360
Ser Glu Ser Cys Thr Ala Glu Asp Gly Ala Thr Ser Arg Pro Leu Ser			
	1365	1370	1375
Ser Pro Pro Gly Arg Asp Ser Leu Tyr Ala Ser Gly Ala Asn Leu Arg			



1380 1385 1390  
Asp Ser Pro Ser Tyr Pro Asp Ser Ser Pro Glu Gly Pro Ser Glu Ala  
1395 1400 1405  
Leu Pro Pro Pro Pro Pro Ala Pro Pro Gly Pro Pro Glu Ile Tyr Tyr  
1410 1415 1420  
Thr Ser Arg Pro Pro Ala Leu Val Ala Arg Asn Pro Leu Gln Gly Tyr  
1425 1430 1435 1440  
Tyr Gln Val Arg Arg Pro Ser His Glu Gly Tyr Leu Ala Ala Pro Gly  
1445 1450 1455  
Leu Glu Gly Pro Gly Pro Asp Gly Asp Gly Gln Met Gln Leu Val Thr  
1460 1465 1470  
Ser Leu

<210> 6

<211> 4422

<212> DNA

<213> Human

<400> 6

ATGGCCCGCC TAGCCGCACT GCTCTGGAAT CTGTGTGTCA CCGCCGTCCT GGTCACCTCG 60  
GCCACCCAAG GCCTGAGCCG GGCCGGGCTC CCGTTCGGGC TGATGCGCCG GGAGCTGGCG 120  
TGTGAAGGCT ACCCCATCGA GCTGCGGTGC CCCGGCAGCG ACGTCATCAT GGTGGAGAAT 180  
GCCAACTACG GGCGCACGGA CGACAAGATT TCGATGCTG ACCCTTTCCA GATGGAGAAT 240  
GTGCAGTGCT ACCTGCCGGA CGCCTTCAAG ATCATGTCAC AGAGGTGTAA CAACCGCACC 300  
CAGTGCGTGG TGGTCGCCGG CTCGGATGCC TTTCCTGACC CCTGTCCTGG GACCTACAAG 360  
TACCTGGAGG TGCAGTACGA CTGTGTCCCC TACAAAGTGG AGCAGAAAGT CTTCGTGTGC 420  
CCAGGGACCC TGCAGAAGGT GCTGGAGCCC ACCTCGACAC ACGAGTCAGA GCACCAGTCT 480  
GGCGCATGGT GCAAGGACCC GCTGCAGGCG GGTGACCGCA TCTACGTGAT GCCCTGGATC 540

CCCTACCGCA CGGACACACT GACTGAGTAT GCCTCGTGGG AGGACTACGT GGCCGCCCCG 600  
CACACCACCA CCTACCGCCT GCCCAACCGC GTGGATGGCA CAGGCTTTGT GGTCTACGAT 660  
GGTGCCGTCT TCTACAACAA GGAGCGCAGC CGCAACATCG TCAAGTATGA CCTACGGACG 720  
CGCATCAAGA GCGGGGAGAC GGTCAATCAAT ACCGCCAACT ACCATGACAC CTCGCCCTAC 780  
CGCTGGGGCG GAAAGACCGA CATTGACCTG GCGGTGGACG AGAACGGGCT GTGGGTTCATC 840  
TACGCCACTG AGGGCAACAA CGGGCGGCTG GTGGTGAGCC AGCTGAACCC CTACACACTG 900  
CGCTTTGAGG GCACGTGGGA GACGGGTTAC GACAAGCGCT CGGCATCCAA CGCCTTCATG 960  
GTGTGTGGGG TCCTGTACGT CCTGCGCTCC GTGTACGTGG ATGATGACAG CGAGGCGGCT 1020  
GGCAACCGCG TGGACTATGC CTTCAACACC AATGCCAACC GCGAGGAGCC TGTCAGCCTC 1080  
ACCTTCCCCA ACCCCTACCA GTTCATCTCC TCCGTTGACT ACAACCCTCG CGACAACCAG 1140  
CTGTACGTCT GGAACAATA TTTCTGGTG CGCTACAGCC TGGAGTTCGG GCCGCCCCGAC 1200  
CCCAGTGCTG GCCCAGCCAC TTCCCCACCC CTCAGCACGA CCACCACAGC CAGGCCCACG 1260  
CCCCTCACCA GCACAGCCTC GCGCGCAGCC ACCACCCCGC TCCGCCGGGC ACCCCTCACC 1320  
ACGCACCCAG TGGGTGCCAT CAACCAGCTG GGACCTGATC TGCCTCCAGC CACAGCCCCA 1380  
GTCCCCAGCA CCCGGCGGCC CCCAGCCCCG AATCTACAG TGTCCTCTGA GCTCTTCTGC 1440  
GAGCCCCGAG AGGTACGGCG GGTCCAGTGG CCGGCCACCC AGCAGGGCAT GCTGGTGGAG 1500  
AGGCCCTGCC CCAAGGGGAC TCGAGGAATT GCCTCCTTCC AGTGTCTACC AGCCTTGGGG 1560  
CTCTGGAACC CCCGGGGCCC TGACCTCAGC AACTGCACCT CCCCCTGGGT CAACCAGGTG 1620  
GCCCAGAAGA TCAAGAGTGG GGAGAACCGG GCCAACATCG CCAGCGAGCT GGCCCGACAC 1680  
ACCCGGGGCT CCATCTACGC GGGGGACGTC TCCTCCTCTG TGAAGCTGAT GGAGCAGCTG 1740  
CTGGACATCC TGGATGCCCA GCTGCAGGCC CTGCGGCCCA TCGAGCGCGA GTCAGCCGGC 1800  
AAGAACTACA ACAAGATGCA CAAGCGAGAG AGAACTTGTA AGGATTATAT CAAGGCCGTG 1860  
GTGGAGACAG TGGACAATCT GCTCCGGCCA GAAGCTCTGG AGTCCTGGAA GGACATGAAT 1920  
GCCACGGAGC AGGTGCACAC GGCCACCATG CTCCTCGAGC TCCTGGAGGA GGGCGCCTTC 1980  
CTGCTGGCCG ACAATGTCAG GGAGCCTGCC CGCTTCCTGG CTGCCAAGGA GAACGTGGTC 2040  
CTGGAGGTCA CAGTCTGAA CACAGAGGGC CAGGTGCAGG AGCTGGTGTT CCCCCAGGAG 2100

GAGTACCCGA GAAAGAACTC CATCCAGCTG TCTGCCAAAA CCATCAAGCA GAACAGCCGC 2160  
AATGGGGTGG TCAAAGTTGT CTTTCATCCTC TACAACAACC TGGGCCTCTT CCTGTCCACG 2220  
GAGAATGCCA CAGTGAAGCT GGCCGGCGAA GCAGGCCCGG GTGGCCCTGG GGGCGCCTCT 2280  
CTAGTGGTGA ACTCACAGGT CATCGCAGCA TCCATCAACA AGGAGTCCAG CCGCGTCTTC 2340  
CTCATGGACC CTGTCATCTT CACCGTGGCC CACCTGGAGG ACAAGAACCA CTTCAATGCT 2400  
AACTGCTCCT TCTGGAAC TA CTCGGAGCGT TCCATGCTGG GCTATTGGTC GACCCAAGGC 2460  
TGCCGCCTGG TGGAGTCCAA CAAGACCCAT ACCACGTGTG CCTGCAGCCA CCTCACCAAC 2520  
TTCGCTGTGC TCATGGCTCA CCGTGAGATC TACCAGGGCC GCATCAACGA GCTGCTGCTG 2580  
TCGGTCATCA CCTGGGTGGG CATTGTGATC TCCCTGGTCT GCTTGGCCAT CTGCATCTCC 2640  
ACCTTCTGCT TCCTGCGGGG GCTGCAGACC GACCGCAACA CCATCCACAA GAACCTGTGC 2700  
ATCAACCTCT TCCTGGCTGA GCTGCTCTTC CTGGTCGGGA TCGACAAGAC TCAGTATGAG 2760  
ATTGCCTGCC CCATCTTCGC CGGCCTGCTG CACTATTTCT TCCTGGCTGC CTTCTCCTGG 2820  
CTGTGCCTGG AGGGCGTGCA CCTCTACCTG CTACTAGTGG AGGTGTTTGA GAGCGAGTAT 2880  
TCCCGCACCA AGTACTACTA CCTGGGTGGC TACTGCTTCC CGGCCCTGGT GGTGGGCATC 2940  
GCGGCTGCCA TTGACTACCG CAGCTACGGC ACCGAGAAGG CCTGCTGGCT CCGAGTGGAC 3000  
AATTACTTCA TCTGGAGTTT CATCGGGCCA GTCTCCTTCG TTATCGTGGT CAACCTGGTG 3060  
TTCCTCATGG TGACCCTGCA CAAGATGATC CGAAGCTCAT CTGTGCTCAA GCGCGACTCC 3120  
AGCCGCCTGG ACAACATTAA ATCCTGGGCG CTGGGGGCCA TCGCGCTGCT GTTCCTGCTG 3180  
GGCCTCACCT GGGCTTTTCG CCTCCTCTTC ATCAACAAGG AGTCGGTGGT CATGGCCTAT 3240  
CTCTTCACCA CCTTCAACGC CTCCAGGGG GTCTTCATCT TCGTCTTTCA CTGCGCCTTA 3300  
CAGAAGAAGG TGCACAAGGA GTACAGCAAG TGCCTGCGTC ACTCCTACTG CTGCATCCGC 3360  
TCCCCACCCG GGGGCACTCA CGGATCCCTC AAGACCTCAG CCATGCCAAG CAACACCCGC 3420  
TACTACACAG GGACCCAGAG CCGAATTCGG AGGATGTGGA ATGACACTGT GAGGAAACAG 3480  
ACGGAGTCCT CCTTCATGGC GGGTGACATC AACAGCACCC CCACCCTGAA CCGAGGTACC 3540  
ATGGGGAACC ACCTGCTGAC CAACCCCGTG CTGCAGCCCC GTGGGGGCAC CAGTCCCTAC 3600  
AACACCCTCA TCGCCGAGTC AGTGGGCTTC AATCCCTCCT CGCCCCCTGT CTTCAACTCC 3660

CCAGGGAGCT ACCGGGAACC CAAGCACCCC TTGGGAGGCC GGAAGCCTG TGGCATGGAC 3720  
ACCCTGCCCC TGAACGGCAA CTTCAATAAC AGTTACTCCT TCGAAGTGG GGATTTCCT 3780  
CCCGGGGATG GGGGCCCTGA GCCGCCCCGA GGCCGGAACC TAGCCGATGC GCGGCCTTT 3840  
GAGAAGATGA TCATCTCAGA GCTGGTGAC AACAACTGC GGGGGAGCAG CAGCGCGGCC 3900  
AAGGGCCCTC CACCGCCTGA GCCCCCTGTG CCACCTGTGC CAGGGGGCGG GGGCGAGGAA 3960  
GAGGCGGGCG GCGCGGGGG TGCTGACCGG GCCGAGATTG AACTTCTCTA TAAGGCCCTG 4020  
GAGGAGCCTC TGCTGCTGCC CCGGGCCCAG TCGGTGCTGT ACCAGAGCGA TCTGGACGAG 4080  
TCGGAGAGCT GCACGGCCGA GGACGGCGCC ACCAGCCGGC CCCTCTCCTC CCCTCCTGGC 4140  
CGGGACTCCC TCTATGCCAG CGGGGCCAAC CTGCGGGACT CACCCTCCTA CCCGGACAGC 4200  
AGCCCTGAGG GGCCCAGTGA GGCCCTGCCC CCACCCCTC CCGCACCCCC CGGCCCCCCC 4260  
GAAATCTACT ACACCTCGCG CCCGCCAGCC CTGGTGGCCC GGAATCCCCT GCAGGGCTAC 4320  
TACCAGGTGC GCGTCCTAG CCACGAGGGC TACCTGGCAG CCCAGGCCT TGAGGGGCCA 4380  
GGGCCCAGT GGGACGGCA GATGCAGCTG GTCACCAGTC TC 4425

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/03909

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.<sup>6</sup> C07K14/705, C12N15/12, C12P21/02, C07K16/28, G01N33/50,  
A61K38/17, C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.<sup>6</sup> C07K14/705, C12N15/12, C12P21/02, C07K16/28, G01N33/50,  
A61K38/17, C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

GenBank/EMBL/DBJ/GenSeq  
SwissProt/PIR/GenSeq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> A	Genomics Vol.26 No.2 (1995) Baud V. et al. "EMR1, an unusual member in the family of hormone receptors with seven transmembrane segments" p.334-344	15,16 1-14
X	Neuron Vol.18 (1997) Krasnoperov V.G. et al. "α-Latroxin stimulates exocytosis by the interaction with a neuronal G-protein-coupled receptor" p.925-937	1-16
X	The Journal of Biological Chemistry Vol.272 No.34 (1997) Lelianaova V.G. et al. "α-Latroxin receptor, latrophilin, is a novel member of the secretin family of G-protein-coupled receptors" p.21504-21508	1-16
P, X	WO, 98/39440, A2 (Univ. New York State) 11 September, 1998 (11.09.98) & AU, 9866853, A	1-16
P, X	DNA Research Vol.5 (1998 Oct.) Nagase T. et al. "Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XI. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro" p.277-286	1-16

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
05 November, 1999 (05.11.99)

Date of mailing of the international search report  
16 November, 1999 (16.11.99)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/03909

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	FEBS Letters Vol. 443 (1999 Jan.) Matsushita H. et al. "The latrophilin family: multiply spliced G protein-coupled receptors with differential tissue distribution" p. 348-352	1-16
P, X	The Journal of Biological Chemistry Vol. 274 No. 9 (1999 Feb.) Ichtchenko K. et al. "A novel ubiquitously expressed $\alpha$ -latrotoxin receptor is a member of the GPCR family of G-protein-coupled receptors" p. 5491-5498	1-16